

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**DETECCIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA AMBIENTAL Y
CONFOCAL DE BIOPELÍCULAS BACTERIANAS EN OTITIS MEDIA
EXPERIMENTAL Y MATERIALES IMPLANTADOS**

ANDRÉS IBÁÑEZ MAYAYO

MADRID, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**DETECCIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA AMBIENTAL Y
CONFOCAL DE BIOPELÍCULAS BACTERIANAS EN OTITIS MEDIA
EXPERIMENTAL Y MATERIALES IMPLANTADOS**

DIRECTORES:

DR. RAFAEL RAMIREZ CAMACHO

Profesor Titular de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid.

Jefe de Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda.

DRA. MARÍA ALMUDENA TRINIDAD CABEZAS

Profesora Asociada de la Universidad Autónoma de Madrid.

Médico Adjunto del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda.

ANDRÉS IBÁÑEZ MAYAYO

MADRID, 2012

D. RAFAEL RAMÍREZ-CAMACHO, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor
Titular de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid y

DÑA ALMUDENA TRINIDAD CABEZAS, Doctora en Medicina y Cirugía,
Profesora asociada de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN:

Que D. ANDRÉS IBÁÑEZ MAYAYO, natural de Madrid, con D.N.I.
51066789G, Licenciado en Medicina y Especialista en Otorrinolaringología, ha
trabajado bajo mi dirección en la elaboración de su Tesis Doctoral:
“Microscopía electrónica de barrido ambiental para la detección de biopelículas
bacterianas, un modelo experimental en oído medio”, considerando que se
encuentra en las debidas condiciones para su defensa ante el Tribunal que
proceda.

Madrid, a 10 de mayo de 2012

Fdo: Dr. R. Ramírez-Camacho

Fdo: Dra A. Trinidad Cabezas

AGRADECIMIENTOS.

La realización de este trabajo experimental ha sido una tarea hermosa que me ha permitido conocer de primera mano el método científico-investigador, complemento fundamental de la labor de un médico asistencial. Sin embargo, esta tesis doctoral es el fruto de muchas horas de dedicación. No se trata ni mucho menos de un trabajo individual. En él han cooperado numerosos profesionales, muchos de ellos ya eran amigos y otros han terminado siéndolo. A todos ellos les estaré siempre profundamente agradecido.

En primer lugar debo dar las gracias a los directores de la tesis, el Dr Rafael Ramírez Camacho y la Dra Almudena Trinidad, que se han implicado de forma constante y han sido los verdaderos motores de este trabajo. Sin sus consejos y directrices esta tesis doctoral no podría haberse realizado.

También agradezco al Dr Diego Dámaso, Ana Cabanas y María Muñoz, del Servicio de Microbiología del Hospital Puerta de Hierro, y al personal de Instituto Carlos III de Majadahonda, por su ayuda en la parte microbiológica de esta tesis doctoral. A D. David Gómez y D. Julio San Román, del Instituto Lora Tamayo, por su colaboración con el microscopio electrónico de barrido ambiental; al personal del Museo de Ciencias Naturales, a Paloma y Maria José Coronado, de la Unidad de Microscopía Confocal del Hospital Universitario Puerta de Hierro, por sus enseñanzas y consejos; al Servicio de Cirugía Experimental y a la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro, por permitir la utilización de sus

instalaciones para la realización de la parte experimental del trabajo; y a los técnicos, auxiliares y veterinarios de este Servicio, por su cooperación en todo momento.

Debo hacer una mención especial al Laboratorio farmacéutico Diater, que ha financiado los gastos económicos que el trabajo experimental ha supuesto y, en particular, a Javier Alcover, por su entusiasmo y disponibilidad.

Sería injusto pasar por alto a los médicos, residentes, enfermeras, auxiliares, secretarias del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Puerta de Hierro y al personal de quirófano, con los que he trabajado en los últimos ocho años, por su ayuda de forma directa o indirecta en la realización de esta tesis doctoral, pero sobre todo por ser como son, por haberme formado como especialista y como persona, por regalarme su amistad y por haberme hecho sentir durante estos años como si estuviera en mi segunda casa.

DEDICATORIA

A mis padres, a mis hermanos y abuelos. Sus enseñanzas, su cariño, apoyo y comprensión han sido constantes a lo largo de estos años. Son ellos responsables de todas las cosas buenas que me han pasado y que ahora sea capaz de hacer un trabajo como éste.

A Silvia, por su paciencia durante la fase de escritura de la tesis, pero sobre todo por su forma de ser, por su apoyo incondicional y por hacerme feliz a diario.

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

I INTRODUCCIÓN	1
1. DESAFÍOS ACTUALES EN OTITIS MEDIA.	3
1.1. CONOCIMIENTOS ACTUALES.	3
1.1.1. Definición.	3
1.1.2. Clasificación.	3
1.1.3. Epidemiología.	5
1.1.4. Fisiopatología.	6
1.1.5. Teoría de continuum de la otitis media.	7
1.1.6. Etiología.	9
1.1.6.1. Factores dependientes del huésped.	9
1.1.6.2. Factores infecciosos.	10
1.1.7. Diagnóstico.	11
1.1.8. Tratamiento.	11
1.1.8.1. Tratamiento de la OMA.	11
1.1.8.2. Tratamiento de la OMS.	12
1.1.8.3. Tratamiento de la OMC.	13
1.2. FORMAS CRÓNICAS Y RESISTENTES AL TRATAMIENTO.	14
1.2.1. Otitis media aguda recurrente.	14
1.2.2. Otitis media aguda persistente o recaída verdadera.	15
1.2.3. Otitis media serosa crónica.	16
1.2.4. Otitis media crónica supurativa persistente.	16
1.3. CONSIDERACIONES CONTEMPORÁNEAS.	17
1.3.1. Factores no bacterianos.	18
1.3.2. Factores bacterianos. Biopelículas bacterianas.	21

2. BIOPELÍCULAS.	23
2.1. DEFINICIÓN DE BIOPELÍCULA.	23
2.2. COMPOSICIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS.	23
2.3. ESTRUCTURA DE LAS BIOPELÍCULAS.	24
2.4. DESARROLLO DE LAS BIOPELÍCULAS.	25
2.5. FASES EN LA FORMACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS.	26
2.5.1. Unión reversible.	26
2.5.2. Unión irreversible.	27
2.5.3. Maduración de la biopelícula.	27
2.5.3.1. El papel de las moléculas "quorum sensing".	27
2.5.4. Desprendimiento de bacterias.	28
2.6. VENTAJAS DE LAS BIOPELÍCULAS.	29
2.7. MECANISMOS DE RESISTENCIA.	29
2.7.1. Disminución de la difusión de antibióticos a través del glucocálix.	30
2.7.1.2. Barrera física.	30
2.7.1.2. Barrera química.	31
2.7.2. Tasa de crecimiento disminuida.	31
2.7.3. Aumento de la tasa de transferencia genética.	32
2.7.4. Expresión de genes de resistencia.	32
2.7.5. Hipermutación.	33
2.7.6. Multicelularidad.	33
2.8. IMPORTANCIA DE LAS BIOPELÍCULAS EN NUESTRO MEDIO.	34
2.8.1. Biopelículas y enfermedades en humanos.	36
2.8.2. Dispositivos médicos y biopelículas.	40
2.8.2.1. Magnitud de las infecciones de los dispositivos médicos.	41
2.8.2.2. Mecanismos de infección.	41
2.8.3. Biopelículas y enfermedades otorrinolaringológicas.	42
2.8.3.1. Enfermedades del oído.	43

2.8.3.2. Enfermedades de las fosas nasales.	45
2.8.3.3. Enfermedades de la faringe.	45
2.8.3.4 Biopelículas en implantes médicos en ORL.	46
2.9. CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS.	48
2.9.1. Técnicas moleculares.	49
2.9.1.1. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).	49
2.9.1.2. Técnica de "Photorhabdus luminescens lux operon".	51
2.9.2. Técnicas de imagen de alta resolución.	52
2.9.2.1. Microscopio electrónico de transmisión (MET).	52
2.9.2.2. Microscopio electrónico de barrido (MEB).	54
2.9.2.3. Microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA).	55
2.9.2.4. Microscopio confocal láser de barrido (MCLB).	58

3. MODELOS ANIMALES DE BIOPELÍCULAS

EN OÍDO MEDIO.

3.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE BIOPELÍCULAS EN OÍDO MEDIO.	60
3.1.1. Modelos experimentales en chinchilla.	60
3.1.1.1. <i>Haemophilus influenzae</i> .	60
3.1.1.2. Inoculación nasal de <i>Streptococcus Pneumoniae</i> .	61
3.1.2. Modelo experimental en primate.	61
3.1.3. Modelo experimental en rata.	62
3.1.3.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> intratimpánico.	62
3.1.3.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> vía nasal.	62

II OBJETIVOS.

65

III MATERIAL Y MÉTODOS.

69

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

71

3.2. BACTERIA EMPLEADA.

72

3.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

73

3.4. BIOMATERIALES.

74

3.4.1. Titanio.

74

3.4.2. Hidroxiapatita.

74

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

74

3.5.1. Modelo de formación de biopelículas en oído medio de rata.

74

3.5.2. Estudio del desarrollo de biopelículas sobre biomateriales in vivo.

75

3.6. TÉCNICA QUIRÚRGICA.

75

3.6.1. Anestesia.

75

3.6.2. Cauterización de la trompa de Eustaquio.

76

3.6.3. Preparación quirúrgica.

77

3.6.4. Abordaje quirúrgico del oído medio.

78

3.6.5. Inoculación, implantación y cierre.

79

3.7. ESTUDIO PRE-SACRIFICIO.	80
3.7.1. Exploración vestibular.	80
3.7.2. Otomicroscopia.	81
3.8. SACRIFICIO.	82
3.9. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.	82
3.9.1. Muestras microbiológicas.	82
3.9.2. Determinación de la cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	83
3.9.3. Microscopía de barrido ambiental (MEBA).	83
3.9.3.1. Toma de muestras para MEBA.	83
3.9.3.2. Procesamiento de las muestras obtenidas para MEBA	83
3.9.3.3. Estudio de las muestras obtenidas para MEBA.	84
3.9.4. Microscopio confocal láser de barrido (MCLB).	85
3.9.4.1. Obtención de muestras para MCLB.	85
3.9.4.2. Procesamiento de las muestras obtenidas para MCLB.	85
3.9.4.3. Estudio de las muestras obtenidas para MCLB.	86

IV RESULTADOS.	87
4.1. RESULTADOS CLÍNICOS.	89
4.1.1. Otomicroscopia.	89
4.1.1.1. Otomicroscopia en oído medio inoculado sin implantación de biomateriales.	89
4.1.1.2. Otomicroscopia en oído medio inoculado e implantado con biomateriales.	90
4.1.2. Alteraciones vestibulares.	91
4.2. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS.	93
4.3. RESULTADOS MICROSCÓPICOS.	93
4.3.1. Resultados con MEBA.	93
4.3.1.1. MEBA en oído medio inoculado sin implantación de biomaterial.	95
4.3.1.2. MEBA en oído medio inoculado e implantado con biomateriales.	105
4.3.2. Resultados con MCLB.	109
V DISCUSIÓN	113
5.1. ELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.	117
5.2. ELECCIÓN DE LA BACTERIA DE EXPERIMENTACIÓN.	118
5.3. BIOMATERIALES EMPLEADOS.	119
5.4. TÉCNICA QUIRÚRGICA.	120
5.4.1. Anestesia.	120

5.4.2. Cauterización de la Trompa de Eustaquio.	120
5.4.3. Abordaje quirúrgico del oído medio.	121
5.5. HALLAZGOS OTOMICROSCÓPICOS.	122
5.6. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.	123
5.7. MÉTODO DE DETECCIÓN DE BIOPELÍCULAS.	124
5.8. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS.	128
5.9 RESULTADOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.	130
5.9.1. Resultados microscopía electrónica en ratas inoculadas.	130
5.9.2. Resultados microscopía electrónica en ratas inoculadas e implantadas con biomateriales.	131
5.10. MODELO DE BIOPELÍCULAS EN EL OÍDO MEDIO DE LA RATA.	133
 VI CONCLUSIONES.	 137
 VII BIBLIOGRAFÍA.	 143
 VIII ANEXO.	 155
Anexo I.	157
Anexo II.	164
Anexo III.	173

ÍNDICE DE TABLAS.

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
TABLA 1.1 Factores de riesgo de OMA recurrente.	14
TABLA 1.2 Factores bacterianos y no bacterianos relacionados con formas crónicas y de resistencia a antimicrobianos.	17
TABLA 1.3 Mecanismos de resistencia de las biopelículas bacterianas.	30
TABLA 1.4. Principales enfermedades relacionadas con biopelículas.	39
TABLA 1.5 Métodos de detección de biopelículas bacterianas.	48
TABLA 4.1 Otoscopia de las ratas de los grupos I a IV.	90
TABLA 4.2 Otoscopia de las ratas implantadas con biomateriales.	91
TABLA 4.3 Exploración vestibular previa al sacrificio.	92
TABLA 4.4 Desarrollo de biopelículas en los grupos I a IV.	100
TABLA 4.5 Desarrollo de biopelículas en mucosa ótica y biomaterial implantado.	107
TABLA 5.1 Métodos de microscopía electrónica para detectar biopelículas.	126
TABLA 5.2 Comparación entre los modelos experimentales publicados de biopelículas en oído medio.	134

ÍNDICE DE FIGURAS.

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1.1 Estructura de las biopelículas bacterianas.	24
Figura 1.2 Colonización de biopelículas en implantes otorrinolaringológicos.	46
Figura 3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 ATCC.	72
Figura 3.2 Cauterización de la Trompa de Eustaquio.	76
Figura 3.3 Posición quirúrgica.	77
Figura 4.1 Diferenciación hueso-biopelícula mediante MEBA.	94
Figura 4.2 Colonización de la mucosa ótica de las ratas 1 a 4 (MEBA).	96
Figura 4.3 Colonización de la mucosa ótica de las ratas 5 a 8 (MEBA).	97
Figura 4.4 Colonización de la mucosa ótica de las ratas 9 a 12 (MEBA).	98
Figura 4.5 Colonización de la mucosa ótica de las ratas 13 a 16 (MEBA).	99
Figura 4.6 Deshidratación de muestras mediante MEBA.	101
Figura 4.7 Colonización en saliente óseo (MEBA).	102
Figura 4.8 Colonización bacteriana en una cavidad timpánica (MEBA).	102
Figura 4.9 Colonización bacteriana en una cavidad timpánica ampliada (MEBA).	103
Figura 4.10 Matriz extracelular (MEBA).	103
Figura 4.11 Biopelículas maduras y agregados aislados.	104

Figura 4.12 Titanio e Hidroxiapatita mediante MEBA.	105
Figura 4.13 Titanio colonizado mediante MEBA.	106
Figura 4.14 Colonización de mucosa y titanio implantado.	108
Figura 4.15 Colonización de mucosa e hidroxiapatita implantada.	108
Figura 4.16 Sección óptica de una biopelícula bacteriana (MCLB).	110
Figura 4.17 Espesor de la biopelícula mediante MCLB.	111
Figura 4.18 Colonización de mucosa e hidroxiapatita implantada (MCLB).	112

ABREVIATURAS.

ABREVIATURAS.

CENS	Cirugía endoscópica nasosinusal.
MCLB	Microscopio confocal láser de barrido.
MEB	Microscopio electrónico de barrido.
MEBA	Microscopio electrónico de barrido ambiental.
MET	Microscopio electrónico de transmisión.
M. Óptica	Microscopía óptica.
OM	Otitis media.
OMA	Otitis media aguda.
OMCC	Otitis media crónica colestomatosa.
OMCS	Otitis media crónica supurativa.
OMS	Otitis media serosa.
ORL	Otorrinolaringología.
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa.
QS	“Quorum sensing”.
RNM	Resonancia nuclear magnética.
TE	Trompa de Eustaquio.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.

I INTRODUCCIÓN.

I INTRODUCCIÓN.

1 DESAFÍOS ACTUALES EN OTITIS MEDIA.

1.1. CONOCIMIENTOS ACTUALES.

1.1.1. Definición.

La otitis media se define como cualquier inflamación que ocurre en el oído medio, independientemente de la causa o la fisiopatología del proceso (1).

1.1.2. Clasificación.

Existen múltiples clasificaciones de las otitis media, en función de la duración de la sintomatología, determinadas características como la presencia o no de derrame timpánico, perforación timpánica, otorrea y otros. Para simplificar este apartado se consideran cuatro entidades clínicas diferenciadas:

1. Otitis media aguda (OMA). Infección aguda de la mucosa del oído medio. Implica el rápido establecimiento de uno o más síntomas de la enfermedad, entre ellos: otalgia, fiebre, otorrea, anorexia, irritabilidad y vómitos o diarrea en niños y lactantes. Habitualmente se observa inflamación o abombamiento de la membrana timpánica y derrame purulento en el oído medio.

2. Otitis media serosa (OMS). También denominada otitis media con derrame, otitis media secretora y otitis mucoide. Se caracteriza por la presencia de líquido seroso, mucoide o mucopurulento en el oído medio con ausencia de síntomas y signos de infección aguda. Habitualmente sigue a un episodio de otitis media aguda.

Tanto la otitis media aguda como la otitis media serosa se producen principalmente en la infancia y con frecuencia se alternan en el mismo

paciente, por lo que actualmente se considera a la otitis media aguda y a la otitis serosa como los dos extremos de un espectro continuo de la misma enfermedad.

3. Otitis media crónica supurativa (OMCS). También denominada otitis media crónica no colesteatomatosa, otitis media crónica simple o benigna. Es una inflamación crónica del oído medio que persiste al menos 6 semanas y está asociada con otorrea a través de una membrana timpánica perforada, un drenaje transtimpánico o una miringotomía quirúrgica. De forma genérica, se incluyen dentro de las otitis medias crónicas supurativas pacientes con formas inactivas, es decir, pacientes que presentan una perforación timpánica crónica con inflamación de la mucosa del oído medio, pero sin otorrea activa.

4. Otitis media crónica colesteatomatosa (OMCC). Consiste en la presencia de epitelio escamoso queratinizante en el interior del oído medio, en las cavidades del hueso temporal o de la mastoides, y que tiende a la expansión, erosionando y destruyendo el tejido óseo que lo rodea. De esta forma puede ocupar el oído medio, destruir el laberinto, el nervio facial e incluso afectar al espacio intracraneal. Los síntomas de presentación más frecuentes incluyen otorrea fétida no dolorosa y resistente a antibióticos, hipoacusia, mareo o acúfenos por afectación del laberinto. De forma menos frecuente, se manifiestan con síntomas derivados de complicaciones como la parálisis facial, vértigo o manifestaciones secundarias a la afectación intracraneal. En la exploración se suele observar tejido de granulación o queratina visible a través de una perforación timpánica atical o mesotimpánica, aunque una membrana timpánica íntegra no descarta la existencia de un colesteatoma. El tratamiento de elección es la extirpación quirúrgica de la

lesión, si bien en ocasiones se utilizan terapias farmacológicas como los antibióticos tópicos cuando existen otorreas de repetición.

1.1.3. Epidemiología.

La otitis media es la segunda enfermedad más común en la infancia, tras las infecciones del tracto respiratorio superior, y la primera causa de atención médica en la población infantil. Se estima que 16 millones de visitas médicas son atribuidas a este problema sólo en Estados Unidos, excluyendo las visitas a los servicios de urgencias médicas (1,2). En la población española, la incidencia de OMA se sitúa en torno al 45% durante el primer año de vida, y la proporción de niños con al menos un episodio de OMA durante el primer año se sitúa en el 32% (3).

La otitis media es la enfermedad que más frecuentemente recibe tratamiento específico en la infancia y provoca más de 20 millones de visitas médicas al año. Varios estudios epidemiológicos recogen una tasa de prevalencia de OMA del 17-20% dentro de los dos primeros años de vida. Se estima que el 90% de los niños han tenido al menos un episodio documentado de OMS en torno a la edad de 2 años. Sin embargo, la prevalencia exacta de la OMS es difícil de conocer, debido a los escasos síntomas que provoca y a que es una enfermedad fundamentalmente infantil.

La otitis media es una enfermedad recurrente. Un tercio de los niños presentan 6 o más episodios de OMA antes de los 7 años.

En los países en vías de desarrollo la otitis media es extremadamente común y persiste como una de las principales causas que contribuyen al

elevado índice de mortalidad infantil, especialmente debido a las complicaciones intracraneales (4).

La edad es un factor relevante observándose un pico de prevalencia en torno a los 6-18 meses. Otros estudios muestran una formación bimodal, situando otro pico de prevalencia en torno a los 4-5 años de edad, correspondiéndose con la escolarización de los niños.

En cuanto al sexo, varios estudios recientes muestran una prevalencia similar entre hombres y mujeres, en contraposición con estudios previos que situaban una mayor prevalencia en el sexo masculino (5,6).

1.1.4. Fisiopatología.

El factor más importante en la patología del oído medio es la disfunción de la trompa de Eustaquio (TE). La mucosa del extremo faríngeo de la TE es parte del sistema mucociliar del oído medio. La alteración de esta mucosa por edema, tumores o presión intratimpánica negativa facilita la extensión directa de procesos infecciosos desde la nasofaringe al oído medio produciendo una otitis media. El contenido esofágico regurgitado hacia la nasofaringe y el oído medio a través de la TE puede crear una alteración mecánica de la mucosa del oído medio y causar inflamación de la misma.

En la población pediátrica, las alteraciones del funcionamiento de la TE, como las que ocurren en niños con paladar hendido o hipertrofia adenoidea, aumentan la prevalencia de otitis media. Además la TE de los niños es más corta y más horizontal, lo que parece favorecer el reflujo de patógenos desde la nasofaringe.

En el caso de la OMA, se ha observado que la inmadurez del sistema inmune y las frecuentes infecciones de la mucosa respiratoria alta juegan un papel importante. Existen estudios que demuestran que las infecciones virales del epitelio respiratorio alto incrementan la disfunción tubárica y la colonización bacteriana en la nasofaringe. Las infecciones virales causan respuestas inflamatorias en la mucosa de la TE. El edema del tejido nasofaríngeo y de la mucosa de la TE provocan la obstrucción de la misma, favoreciendo la retención de secreciones en el oído medio. La presión negativa generada en el oído medio y maniobras como la deglución o el sonado nasal favorecen la subsecuente invasión microbiana del oído medio. La respuesta inmune e inflamatoria aumenta la formación de moco en la caja timpánica (7).

1.1.5. Teoría de continuum de la otitis media.

El derrame timpánico se caracteriza por su tendencia a la resolución. Sin embargo, la otitis secretora puede desarrollar cambios histológicos en los tejidos del oído medio, incluso en el oído interno, a pesar de presentar una membrana timpánica normal. A este fenómeno algunos autores lo denominan otitis media crónica silenciosa. La otitis media aguda, de forma similar a la OMS, puede desembocar en una otitis media crónica silenciosa. Es decir, las distintas formas agudas de presentación de la otitis media pueden mostrar una tendencia similar, con la cronificación en el tiempo. Al objeto de aclarar este fenómeno, se realizó un estudio morfométrico longitudinal del oído medio de los gatos, hecho a los 1-3 días, 1-3 semanas, 4-5 semanas y 3-6 meses tras la obstrucción de la Trompa de Eustaquio. Los estadios tempranos terminaron siendo con el tiempo distintas formas de otitis media (serosa, purulenta,

crónica). Histológicamente se observaron cambios estadísticamente significativos entre estadios no adyacentes, mientras que no existían diferencias estadísticamente significativas entre estadios adyacentes. Este solapamiento sugiere un “continuum” de cambios histopatológicos entre las distintas formas de otitis media (8).

Las alteraciones tisulares de las formas agudas se transforman gradualmente conforme la enfermedad evoluciona, hacia la curación o por el contrario, hacia la cronificación. En las fases precoces predominan los fenómenos vasculares y exudativos, mientras que en las fases tardías también existe vasodilatación, derrame e infiltración inflamatoria densa del mucoperiostio, pero también una transformación fibroplásica notable. Según un criterio anatomopatológico, la otitis media crónica sería una inflamación prolongada que produce lesiones irreversibles de los tejidos del oído medio. Este sería el principal criterio que la distingue de otros procesos que finalmente se resuelven espontáneamente sin dejar lesiones (9).

Aunque no existe un único factor etiológico de la otitis media, la disfunción tubárica sería el factor más frecuentemente asociado con la génesis y cronificación de la otitis media (10,11).

1.1.6. Etiología.

Las causas clásicas de la otitis media podemos dividirlas en factores dependientes del huésped y factores infecciosos.

1.1.6.1. Factores dependientes del huésped.

a) Sistema inmune. Los pacientes con alteraciones del sistema inmune como enfermos con trastornos congénitos, portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), diabéticos y otras situaciones, favorecen el desarrollo de la otitis media. Los mecanismos innatos de defensa o mecanismos específicos de defensa frente a las bacterias, son las formas primarias de prevención frente a la otitis media aguda. El sistema inmune en desarrollo que presentan los niños durante el primer año de vida es menos eficaz en la eliminación de patógenos.

b) Anomalías anatómicas. Las alteraciones del paladar y su musculatura aumentan el riesgo de disfunción tubárica y por tanto de otitis media. De esta forma enfermedades como el paladar hendido, y síndromes malformativos craneofaciales (Crouzon, Down, Treacher Collins, Apert, entre otros), presentan mayor tasa de otitis media. La anatomía de la TE de los niños se caracteriza por ser más ancha, corta y horizontal que la de los adultos. Esta anatomía característica implica una disfunción fisiológica y una mayor propensión al ascenso de los patógenos que colonizan la nasofaringe.

c) Disfunción fisiológica de la mucosa de la TE. En este grupo se incluyen las disfunciones ciliares y el reflujo gastroesofágico (12).

1.1.6.2. Factores infecciosos. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* son las causantes del 95% de las OMA de origen bacteriano. El perfil es diferente en niños por debajo de las seis semanas de edad, con un incremento de los bacilos gram negativos, especialmente *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, llegando a suponer el 20% de los casos (13).

Tradicionalmente se pensó que el derrame timpánico que presentan los pacientes con OMS era un fluido estéril. Así lo mostraban los cultivos que se obtenían tras la realización de timpanocentesis. Sin embargo, este concepto ha cambiado en los últimos años.

En el caso de la OMCS los microorganismos bacterianos más frecuentemente aislados incluyen a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* y *Klebsiella pneumoniae*. Existe discusión acerca del origen de la colonización. Algunos autores defienden la invasión del oído medio a través de la TE, mientras otros consideran la entrada a través de la membrana timpánica perforada desde el conducto auditivo externo (14).

Hoy en día se consideran las causas clásicas de la otitis media como las principales contribuyentes a esta patología. Sin embargo existen otros factores que serán analizados en el apartado 1.3.

1.1.7. Diagnóstico.

El diagnóstico de la otitis media se fundamenta en la historia clínica y en la exploración del paciente. En ocasiones puede ser necesaria la realización de pruebas específicas como la timpanometría, que demuestran la presencia de derrame en la caja del oído medio. Los estudios de laboratorio y las pruebas de imagen (tomografía computerizada y resonancia nuclear magnética) se utilizan para descartar la presencia de colesteatoma, afectación sistémica, presencia de malformaciones anatómicas, enfermedades congénitas o cuando se sospecha alguna complicación de la otitis media.

1.1.8. Tratamiento.

1.1.8.1. Tratamiento de la OMA.

Antes de plantearnos el tratamiento antimicrobiano adecuado, debemos tener en cuenta que la otitis media aguda presenta una tasa de curación espontánea del 80% en el caso de *Moraxella catarrhalis*, 50% para *Haemophilus influenzae* y 16% para *Streptococcus pneumoniae*. Esta tasa de curación espontánea es menor para niños menores de dos años. Además, los niños pequeños con OMA o aquellos con OMA graves, son los que más se benefician de la antibioterapia (15). Siguiendo las recomendaciones de la Academia Americana de Pediatría y la Academia Americana de Médicos de Familia de 2004, deben ser tratados con antibióticos todos los pacientes menores de 6 meses y los que presenten síntomas severos. En aquellos pacientes con una edad superior a 6 meses y con síntomas no severos, puede diferirse la decisión hasta las 48-72 horas en función de la evolución clínica. De

esta forma, la observación en casos seleccionados proporciona la posibilidad de mejorar, sin utilizar el tratamiento antibiótico (2).

Actualmente se considera en España el uso de amoxicilina a dosis altas (80-90 mg/kg/día), como el fármaco de elección en la mayoría de los pacientes. En el caso de fracaso a dicho tratamiento, lactantes, sobre todo los menores de seis meses, pacientes con antecedentes de secuelas por OMA y pacientes graves, el tratamiento recomendado incluye la asociación de amoxicilina y ácido clavulánico a dosis altas. Las cefalosporinas orales (cefuroxima axetilo, cefpodoxima, cefnidir) también presentan un buen perfil antimicrobiano y pueden utilizarse como segunda opción terapéutica ante el fracaso de la amoxicilina (16).

En cuanto a la duración del tratamiento antibiótico se recomienda 10 días en los niños de corta edad, OMA grave y recurrente y 7-10 días en el resto de pacientes (16).

1.1.8.2. Tratamiento de la OMS.

Se han utilizado diversos tratamientos como antibióticos, antihistamínicos y descongestionantes, corticoides nasales y sistémicos, antiinflamatorios no esteroideos, mucolíticos. De todos ellos tan sólo el tratamiento antibiótico utilizado habitualmente para la OMA ha proporcionado beneficio a corto plazo. Los corticoides muestran beneficios limitados según las series, por lo que su uso es controvertido, y no existe evidencia de beneficio a largo plazo. Tampoco parecen mejorar la hipoacusia al administrarlos de forma sistémica, tópica ni asociados a antibióticos (17).

Los pacientes diagnosticados de OMS y que no presentan factores de riesgo, deben ser revisados a intervalos de 3-6 meses, hasta que desaparezca el derrame timpánico, aparezca hipoacusia significativa o se sospechen lesiones o complicaciones a nivel de la membrana timpánica o del oído medio.

Los pacientes que presentan OMS con patología concomitante de riesgo, independientemente de su nivel auditivo, y los que presentan alteraciones en el desarrollo del lenguaje, deben ser intervenidos con mayor rapidez.

El tratamiento quirúrgico recomendado es la miringotomía con colocación de drenajes transtimpánicos. La adenoidectomía no está indicada como tratamiento quirúrgico inicial de la OMS, a menos que existan otros criterios, como la presencia de adenoiditis, obstrucción nasal de origen adenoideo o sinusitis crónica. Se recomienda añadir la adenoidectomía al procedimiento cuando un niño que previamente ha sido tratado quirúrgicamente por OMS, precisa una nueva colocación de drenajes transtimpánicos (18).

1.1.8.3. Tratamiento de la OMC.

El tratamiento básico de las otorreas consiste en la administración de antibióticos tópicos como el ciprofloxacino, la polimixina B o gentamicina. El tratamiento antibiótico por vía sistémica no está indicado, salvo en el caso de resistencias al tratamiento antibiótico local o cuando la gravedad del paciente lo justifique.

El tratamiento quirúrgico tiene dos objetivos principales. En primer lugar, la extirpación del tejido fibromucoso, que ocupa los espacios del oído medio

impidiendo la correcta ventilación, o la extirpación del epitelio patológico, en el caso de la otitis media crónica colestomatosa. En segundo lugar, la reconstrucción de la membrana timpánica y la cadena osicular para evitar nuevas otorreas y recuperar función auditiva (19).

1.2. FORMAS CRÓNICAS Y RESISTENTES AL TRATAMIENTO.

1.2.1. Otitis media aguda recurrente.

FACTORES DE RIESGO DE OMA RECURRENTE
Bajo nivel socioeconómico.
Meses fríos.
Asistencia a guardería.
Sexo masculino.
Historia familiar de OMA recurrente.
Lactancia artificial.
Tabaquismo domiciliario.
Primer episodio precoz.

TABLA 1.1 Factores de riesgo de OMA recurrente.

Se define como la presentación de una OMA con una frecuencia mínima de un episodio cada dos meses y una historia mínima de seis meses de evolución. Es decir, un mínimo de tres episodios en los últimos seis meses. Esta definición incluye las dos siguientes situaciones que se observan

frecuentemente en la clínica: pacientes que presentan derrame continuado entre los episodios de OMA y pacientes que presentan otoscopia normal entre los episodios de OMA (20).

Los factores de riesgo clásicos para la presentación de una OMA recurrente incluyen: bajo nivel socioeconómico, meses fríos, asistencia a guardería, sexo masculino, historia familiar de OMA recurrente, lactancia artificial, tabaquismo domiciliario e inicio temprano del primer episodio (tabla 1.1).

1.2.2. Otitis media aguda persistente o recaída verdadera.

No existe una definición universalmente aceptada para esta entidad y, con frecuencia, se confunde con la OMA recurrente. Desde el punto de vista microbiológico, se considera OMA persistente o recaída, cuando el microorganismo causal es el mismo, tanto en el primero como en el segundo episodio, y la recurrencia, cuando éstos son distintos. La dificultad en la aplicación de esta definición en la práctica clínica diaria hace que se tenga en cuenta el criterio temporal. De esta manera, se considera a cualquier episodio ocurrido en el primer mes postratamiento como el mismo episodio, se trata como tal, y no se contabiliza como una nueva OMA a la hora del seguimiento de una OMA recurrente (16).

1.2.3. Otitis media serosa crónica.

Se define como la presencia de derrame timpánico que persiste en el oído medio, con membrana timpánica íntegra, durante más de 1-3 meses. Se trata de una situación que tiende a la lenta resolución espontánea en un alto porcentaje de los pacientes. Sin embargo es un problema clínico importante. Provoca una situación de hipoacusia, a menudo bilateral, que puede afectar a la población pediátrica durante el período de adquisición del lenguaje, con lo que contribuye a problemas en la integración social del niño y el desarrollo escolar. Además, como se ha comentado previamente, favorece la aparición de OMA de repetición.

1.2.4. Otitis media crónica supurativa persistente.

Se incluyen en este grupo de pacientes, a aquellos enfermos diagnosticados de OMCS que no responden correctamente al tratamiento antibiótico tópico o con frecuentes recidivas. El tratamiento inicial de los pacientes con OMCS se fundamenta en tres puntos básicos: selección del antibiótico tópico apropiado, limpieza cuidadosa y regular del oído y, por último, el control del tejido de granulación.

Los antibióticos habitualmente usados presentan alta actividad frente a los microorganismos causantes de la OMCS. Generalmente se usan soluciones con altas concentraciones de aminoglucósidos y fluorquinolonas que frecuentemente erradican la infección. Sin embargo existen fracasos terapéuticos, a pesar de que los estudios microbiológicos indiquen que las bacterias aisladas en el oído de estos enfermos, son sensibles a las altas concentraciones de antibiótico utilizadas en los tratamientos tópicos.

Tradicionalmente se ha pensado que la presencia de epitelio descamado y exudado mucoso, junto con la presencia de tejido de granulación, dificultaba la penetración de los antibióticos tópicos. En la actualidad se considera la existencia de fenómenos defensivos de los patógenos que serán analizados más adelante. El uso de corticoides tópicos y antibióticos por vía sistémica, no siempre resuelve la otorrea, por lo que con cierta frecuencia la única forma de tratamiento efectivo es la cirugía, con la eliminación mecánica del tejido de granulación del oído medio, antro y mastoides (21).

1.3. CONSIDERACIONES CONTEMPORÁNEAS.

FACTORES CONTEMPORÁNEOS RELACIONADOS CON FORMAS CRÓNICAS DE PATOLOGÍA DE OÍDO MEDIO.
<p>1 Factores no bacterianos.</p> <ul style="list-style-type: none">- Déficit de vitamina A.- Obesidad.- Tipo de mucina.- Factores genéticos.- Infecciones virales.- Factores alérgicos.- Lactancia artificial.- Exposición al humo del tabaco.- Asistencia a guardería-colegio.- Bajo nivel socioeconómico. <p>2 Factores bacterianos. Biopelículas.</p>

TABLA 1.2 Factores bacterianos y no bacterianos relacionados con formas crónicas y de resistencia a antimicrobianos.

Diversos agentes se han relacionado con la cronicidad y falta de respuesta a los agentes inmunes y antimicrobianos en estas patologías. En los últimos años se da especial importancia a los siguientes:

1.3.1. Factores no bacterianos.

a) Déficit de vitamina A y su relación con el incremento de las infecciones de vía aérea superior (22).

b) Obesidad. Se cree que provoca una alteración del perfil de citoquinas implicadas en la otitis media. También favorece el reflujo gastroesofágico (23) .

c) Moco. El papel de las mucinas en la OMS ha sido estudiado en profundidad. Se ha observado que las mucinas son las responsables de las propiedades de las secreciones del oído medio. La expresión génica del moco del oído medio es diferente de la de las secreciones de la nasofaringe. Por lo tanto anomalías en la expresión genética podrían jugar un papel fundamental en la OMS y OMA (24).

d) Factores genéticos. Se ha descrito cierta susceptibilidad familiar, aunque es difícil separar los factores genéticos de los factores ambientales que pueden influir en la expresión genética. Hasta el momento no se ha descrito ningún gen que incremente la susceptibilidad a tener otitis media aunque sí se conocen regiones cromosómicas relacionadas con la otitis media crónica (25).

e) Muchos investigadores han intentado relacionar a los virus respiratorios como un factor que favorece el desarrollo de otitis media. La mayoría de estos agentes virales provocan cambios inflamatorios en la mucosa respiratoria que induce una disfunción de la trompa de Eustaquio, un aumento de la colonización bacteriana y otitis media. Además, los virus parecen alterar

la respuesta inmune a la OMA, contribuyendo a la formación de moco en el oído medio y a la cronicidad de la OMS (26).

Los virus más frecuentemente asociados con OMA son el virus respiratorio sincitial (VRS), virus influenza y parainfluenza, rinovirus y adenovirus.

f) Factores alérgicos. La relación entre la patología alérgica y la otitis media no está por el momento resuelta. En niños menores de 4 años, el sistema inmune está en desarrollo, por lo que la alergia es poco probable que juegue un papel principal en la recurrencia o cronicidad de la otitis media en este grupo de edad. En niños mayores de cuatro años y en adultos existen evidencias que sugieren la importancia de la patología alérgica, aunque también existen argumentos en contra de dicha influencia:

1) Muchos pacientes con otitis media tienen patología alérgica concomitante como asma o rinosinusitis alérgica.

2) Muchos pacientes con otitis media tiene resultados positivos para pruebas cutáneas alérgicas.

3) La otitis media es más común en invierno y al principio de la primavera aunque la mayor acumulación de alérgenos ambientales ocurre al final de la primavera y al principio del otoño.

4) La mayoría de pacientes con otitis media y alergia simultánea no presentan mejoría significativa cuando se realiza un tratamiento antialérgico agresivo, a pesar de la importante mejoría de la sintomatología alérgica (27).

g) Lactancia materna. Los últimos estudios que han intentado relacionar la lactancia materna con el desarrollo de otitis media sugieren una reducción de la incidencia de otitis media de hasta el 13% para los niños alimentados

durante los primeros 3-6 meses con leche materna exclusivamente. Además el efecto protector persiste hasta 12 meses tras el cese de la lactancia, probablemente porque la demora en el primer episodio de otitis media reduce la recurrencia de otitis en estos niños (28).

h) Exposición al humo del tabaco. Los últimos meta-análisis referentes a la influencia del tabaco indican un riesgo aumentado de 1.48, 1.38 y 1.3 de padecer OMA recurrente, OMS y OMA respectivamente (29)

i) Centros de atención comunitarios. La asistencia de los niños a escuelas, guarderías, colegios u otras organizaciones que impliquen el contacto entre varios niños incrementa el riesgo de infecciones respiratorias, colonización nasofaríngea y otitis media. Este efecto se considera tan importante que la Academia Americana de Médicos de Familia recomienda tratamientos antibióticos más potentes y a dosis superiores en pacientes que asisten a este tipo de centros (30).

j) Factores socioeconómicos. En general una situación socioeconómica baja aumenta el riesgo de varios factores inductores de otitis media. Entre ellos consideramos el consumo de tabaco por parte de los padres del paciente, alimentación distinta a la lactancia materna, asistencia a guardería, hacinamiento y exposición a virus y bacterias patógenas. Además, los niños de los grupos socioeconómicos más bajos utilizan los recursos sanitarios con menor frecuencia que los de los estratos más altos (31).

1.3.2. Factores bacterianos. Biopelículas bacterianas.

Como veremos más detalladamente en el apartado 2, la biopelícula bacteriana es una red altamente estructurada de múltiples bacterias envueltas por una matriz que las rodea y las ancla a una determinada superficie. Esta estructura confiere a las bacterias una especial resistencia frente a los agentes agresivos como los cambios medioambientales, el sistema inmune de los seres vivos y los fármacos antibacterianos (32).

La posible influencia de las biopelículas en la patología crónica del oído medio fue inicialmente planteada por Rayner en 1998 (33). Esta hipótesis fue desarrollada para explicar varios aspectos comunes, pero no bien entendidos hasta entonces, de las otitis medias secretorias: La ausencia de respuesta a los antibióticos, la naturaleza crónica y/o recurrente de la otitis media, la observación de derrames timpánicos “estériles” con las técnicas de cultivo habituales, la existencia de una alta proporción de derrames estériles con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) positiva para ADN bacteriano y, por último la demostración de la existencia de ARN mensajero en las secreciones del oído medio, sugiriendo la presencia de replicación bacteriana. Esta última observación demostraría la existencia de vida bacteriana en las distintas formas de otitis media y no sólo de antígenos bacterianos. Por lo tanto es clave en el planteamiento de una base infecciosa de alta resistencia y de difícil detección con los métodos de diagnóstico usados normalmente en la clínica (34).

Una vez la hipótesis de las biopelículas fue planteada, aparecieron datos descriptivos de cambios en la histopatología del oído medio que apoyaban la presencia de biopelículas bacterianas. Asimismo, han ido describiéndose datos

de la composición química de la matriz extracelular de las biopelículas, se ha demostrado la capacidad de formar biopelículas, tanto in vitro como in vivo, por parte de los agentes patógenos habituales en las distintas formas de otitis media, e incluso, se han desarrollado modelos animales de otitis media que demuestran la implicación de las biopelículas bacterianas (35,36).

Estas observaciones pueden explicar la naturaleza crónica y las recaídas que se observan frecuentemente en las distintas formas de otitis media: OMA recurrente, OMA persistente, OMS crónica y OMCS persistente (37,38). Hasta el momento y dada la resistencia de las biopelículas a los tratamientos médicos, la extracción de los tejidos o materiales infectados es obligatorio. Por lo tanto, el conocimiento de los componentes de las biopelículas en la otitis media es crucial en la elaboración de estrategias para su prevención. El desarrollo de medicamentos que combatan proteínas específicas de la matriz extracelular podría reducir el efecto nocivo de estas estructuras bacterianas y de esta manera, convertir las formas crónicas y resistentes al tratamiento, que habitualmente requieren cirugía, en enfermedades tratables con fármacos o vacunas.

2. BIOPELÍCULAS.

2.1. DEFINICIÓN DE BIOPELÍCULA.

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos embebidos en una matriz extracelular de exopolisacáridos creada por ellos mismos. Estas estructuras se desarrollan adheridas a una superficie inerte o a un tejido vivo (2,32). Se encuentran presentes prácticamente en todos los ecosistemas naturales y patogénicos (39,40).

Las bacterias existen en dos estados básicos: en forma planctónica (las habitualmente cultivables en laboratorios microbiológicos) o en forma sésil (las que forman las biopelículas). Las formas planctónicas son importantes para la rápida proliferación y extensión a nuevos territorios, mientras que las sésiles presentan un crecimiento lento y centrado en la perseverancia. Las biopelículas muestran un fenotipo distinto a las formas planctónicas en cuanto a tasa de crecimiento y transcripción genética.

2.2. COMPOSICIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS.

Las biopelículas bacterianas están compuestas por células, con frecuencia bacterias de distintas especies (15% del volumen total de la biopelícula), y por matriz extracelular (aproximadamente 85% del volumen). La matriz extracelular, también llamada glucocálix, está mayoritariamente compuesta por agua, aproximadamente en un 95%. Otros componentes de la matriz extracelular son exopolisacáridos y macromoléculas como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, nutrientes y productos procedentes de la lisis de las bacterias (41,42).

2.3. ESTRUCTURA DE LAS BIOPELÍCULAS.

Las biopelículas maduras forman estructuras que se asemejan a torres o setas, a veces tan altas como varios milímetros. La matriz extracelular se organiza formando un sistema de circulación primitivo mediante la creación de pequeños canales para el transporte de nutrientes, agua y productos de desecho.

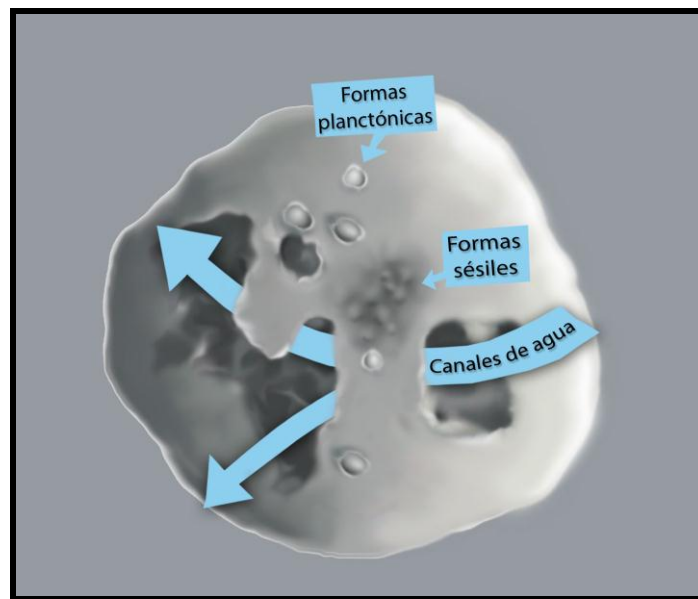


Figura 1.1 Estructura de las biopelículas bacterianas. Esquema de una biopelícula bacteriana en donde se diferencian células planctónicas y sésiles y los característicos canales de agua.

Esta particular estructura celular permite la existencia de muchos microambientes dentro de la misma colonia, debido a las diferencias en las condiciones locales de disponibilidad de nutrientes, pH, nivel de oxidación y otras. De esta forma, las células que se sitúan en la superficie de la biopelícula están expuestas a concentraciones de oxígeno superiores a las células más internas, que viven en condiciones cercanas a la anaerobiosis (43,44). La existencia de este gradiente también se reproduce de forma análoga con otros nutrientes y con los metabolitos de desecho. Como se verá más adelante en el

apartado 2.7., esta heterogeneidad, en cuanto a estructura y estado metabólico, y los distintos fenotipos bacterianos dentro de las biopelículas, proporcionan a la comunidad una gran capacidad de resistencia al estrés, a los sistemas inmunes de los seres vivos y a los agentes antimicrobianos.

Esta sofisticada organización celular está autorregulada por diversas señales celulares, las primeras de las cuales fueron identificadas en 1998 (45).

2.4. DESARROLLO DE LAS BIOPELÍCULAS.

La formación de biopelículas es un proceso complejo y dinámico. Estudios microbiológicos en diversos ecosistemas han determinado que las bacterias forman biopelículas de forma similar, independientemente del ambiente en el que se encuentren (46). Las bacterias se adhieren a superficies de forma reversible inicialmente y, posteriormente, de forma irreversible, desarrollando finalmente una comunidad bacteriana altamente estructurada.

La adherencia a una determinada superficie varía en función de un gran número de variables incluyendo la especie bacteriana, la composición de la pared bacteriana, la naturaleza de la superficie de anclaje, la disponibilidad de nutrientes y la comunicación intercelular entre otros (47). El contacto entre la bacteria y la superficie de anclaje es clave en el desarrollo de las biopelículas. De este modo, se ha observado que la presencia de moléculas específicas puede influir en esta interacción. Así, determinadas proteínas séricas disminuyen la adherencia de *Streptococcus pneumoniae* a materiales plásticos. La unión entre bacteria y superficie de anclaje es clave, ya que a mayor adhesividad, mayor la virulencia de las infecciones a nivel experimental (48,49).

2.5. FASES EN LA FORMACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS.

En general, se pueden distinguir cuatro fases en el proceso de formación de las biopelículas:

2.5.1. Unión reversible.

Consiste en la interacción inicial entre las células bacterianas y la superficie de unión. En este momento entran en juego procesos físicos, químicos y biológicos. Cuando la unión es a una superficie abiótica, está mediada por interacciones no específicas, como fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas o por fuerzas de Van der Waals. Cuando la unión es a superficies bióticas como los tejidos biológicos, se produce a través de mecanismos moleculares específicos como lecitinas o adhesinas (50).

Las células planctónicas inician el contacto con una determinada superficie de forma casual, o bien dirigidas por fenómenos de quimiotaxis y motilidad celular. La tasa de unión bacteriana a distintas superficies está mediada por diversas características físicas, como la hidrofobicidad de las mismas, que a su vez está determinada por la composición proteica de dichas superficies. Hay estudios que sugieren que la motilidad de las células planctónicas es fundamental para el contacto con la superficie abiótica y para que la célula bacteriana supere las fuerzas de repulsión entre bacteria y superficie de anclaje (51). Los flagelos y los pili tipo IV bacteriano inducen un movimiento característico conocido en inglés como "twitching motility", fundamental en la adhesión bacteriana y en la migración celular sobre la superficie de anclaje para formar agregados multicelulares (52).

2.5.2. Unión irreversible.

Tras la unión, las células bacterianas comienzan un proceso de adhesión irreversible, proliferación y acumulación de células agrupadas en múltiples capas. En este momento la matriz extracelular juega un papel crucial para aumentar la estructura de la biopelícula, proteger de agentes externos antimicrobianos y para la retención de nutrientes que permitan el crecimiento de la biopelícula.

Durante esta fase se produce la activación de muchos genes relacionados con el cambio de la forma planctónica a sésil (50).

2.5.3. Maduración de la biopelícula.

Tras la fase de unión irreversible, se produce un cambio fenotípico y se inicia la maduración de la biopelícula. Se forman microcolonias mediante la división celular, el desplazamiento de células ya adheridas a la superficie de anclaje y por último mediante el reclutamiento de otras células planctónicas.

Esta fase se caracteriza por la gran producción de componentes de la matriz extracelular que interactúan entre sí para formar el glucocálix. Finalmente se forma una compleja estructura tridimensional cuya unidad básica es la microcolonia (40).

2.5.3.1 El papel de las moléculas "quorum sensing".

Las células bacterianas se comunican a través de la secreción y la difusión de pequeñas moléculas llamadas en inglés "quorum sensing" (QS). Se trata de moléculas de comunicación intercelular que actúan a nivel de la expresión genética bacteriana para el control del volumen celular. De esta

forma, y en función de las condiciones ambientales, las propias bacterias coordinan su expresión genética para facilitar la supervivencia de la comunidad bacteriana. Lo hacen regulando varias funciones como la motilidad, la síntesis de sustancias tóxicas, el intercambio de ácido desoxirribonucleico (ADN) y la formación de biopelículas (52).

Los QS se han descrito en gran número de bacterias. Algunas de las señales descubiertas incluyen lactonas, péptidos cortos o aminoácidos, furanosil borato y otros. Estas señales moleculares se acumulan en el entorno y son transportadas al interior de las células bacterianas mediante difusión o utilizando mecanismos activos. Una vez en el interior de la célula, los QS se unen a sus respectivos receptores que generan una cascada de señales para la activación o represión de determinados genes (53).

Una de las bacterias más estudiadas ha sido la *Pseudomonas aeruginosa*. Existen al menos dos QS identificadas para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedente de pulmones con fibrosis quística. Sin embargo estas señales sólo se detectan cuando existe cierta concentración celular y no en los estadios iniciales (54).

2.5.4. Desprendimiento de bacterias.

Las células bacterianas que se desprenden de la biopelícula se reconvierten al estado planctónico y pueden colonizar áreas vírgenes e iniciar nuevamente la formación de otras biopelículas. El flujo de líquido, en torno y a través de la biopelícula, podría romper fragmentos de biopelícula y transportar células fuera de la superficie de anclaje (55). La ausencia de nutrientes, la pérdida de la sustancia extracelular, la sobreexpresión de algunas enzimas

como la alginato liasa y la probable influencia de los QS, parecen estar implicadas en el control del desprendimiento bacteriano (56,57).

2.6. VENTAJAS DE LAS BIOPELÍCULAS.

Los estudios clásicos microbiológicos se han centrado en las formas planctónicas de las bacterias, responsables de la mayor parte de las enfermedades infecciosas clásicas. Sin embargo, hoy sabemos que las formas sésiles son más comunes en la naturaleza de lo que se pensaba inicialmente. Se estima que más del 80% de la biomasa bacteriana vive en forma de biopelículas y que las biopelículas están involucradas en más del 75% de las infecciones humanas (58).

La razón para esta supremacía es la capacidad de supervivencia. El hecho de que las biopelículas prevalezcan a lo largo de la evolución en la naturaleza y en el ámbito industrial sugiere que este fenotipo se desarrolló temprano en la evolución, cuando la supervivencia en un medio ambiente hostil era crucial. Estas organizaciones celulares se han demostrado más resistentes a las variaciones de temperatura, pH, humedad, antimicrobianos y al efecto de los sistemas inmunológicos de los seres vivos (59).

2.7. MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Centrándonos en el ámbito microbiológico, las bacterias en forma de biopelícula pueden resistir concentraciones de antibióticos miles de veces superiores a las que las bacterias planctónicas soportan. Además, cuando las bacterias dentro de las biopelículas son sometidas a antibióticos, los pequeños

grupos de células supervivientes presentan aún mayor resistencia antibiótica (60).

La resistencia bacteriana es explicada mediante distintos mecanismos.

MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LAS BIOPELÍCULAS.
1 Disminución de la difusión. Glucocálix. <ul style="list-style-type: none">- Barrera física.- Barrera química.
2 Tasa de crecimiento disminuida.
3 Aumento de la transferencia genética.
4 Expresión de genes de resistencia.
5 Hipermutación.
6 Multicelularidad.

TABLA 1.3 Mecanismos de resistencia de las biopelículas bacterianas.

2.7.1. Disminución de la difusión de antibióticos a través del glucocálix.

La matriz extracelular tiene la capacidad de reducir el paso de antibióticos y biocidas. Lo hace de dos formas principales:

2.7.1.1. Barrera física.

La matriz extracelular actúa como una barrera protectora contra las fluctuaciones medioambientales (humedad, pH, temperatura, exposición a luz ultravioleta) y dificulta la fagocitosis y la accesibilidad del sistema inmune.

Las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, ricas en polímeros como el alginato y ácido colánico, presentan una matriz extracelular muy estructurada

y densa que favorece una difusión más lenta de antibióticos como la tobramicina y la gentamicina (61).

2.7.1.2. Barrera química.

Mediante la interacción química con componentes del glucocálix, la matriz extracelular se comporta como una barrera iónica, secuestrando antibióticos hidrofílicos y cargados positivamente como los aminoglucósidos.

Las betalactamasas se acumulan dentro de la matriz de la biopelícula, favoreciendo la inactivación de antibióticos betalactámicos de forma más eficaz, antes de que éstos difundan dentro de las células. Las condiciones adversas, en cuanto a nutrientes y presencia de biocidas, son detectadas por las células, que inducen una respuesta genética favorable regulada por los QS.

2.7.2. Tasa de crecimiento disminuida.

Debido a la limitación de sustancias nutritivas, las células bacterianas presentan una tasa de crecimiento menor, comparable a la tasa de crecimiento de las células en fase estacionaria. Realmente las células bacterianas que conforman una biopelícula, constituyen una población heterogénea con variables tasas de crecimiento según las zonas de la biopelícula. La tasa de crecimiento elevada aumenta la sensibilidad de las bacterias a antimicrobianos. De esta forma, las células dispuestas en el interior de la biopelícula, sometidas a una baja concentración de oxígeno y nutrientes, presentan un crecimiento muy bajo y por lo tanto una menor susceptibilidad a los antibióticos (62).

2.7.3. Aumento de la tasa de transferencia genética.

Las bacterias pueden adquirir la resistencia a antibióticos a través de la transferencia de genes de forma horizontal, como en el caso de los plásmidos, o a través de mutaciones en distintos cromosomas. La organización bacteriana en forma de biopelícula, debido al contacto íntimo entre las células y a la estabilidad de las bacterias, favorece la transmisión de material genético. De esta forma puede extenderse la resistencia celular a antibióticos. Estudios genéticos han demostrado que la tasa de conjugación de material genético es muy superior en las bacterias sésiles cuando se compara con las formas planctónicas (63).

2.7.4. Expresión de genes de resistencia.

Las células bacterianas organizadas en forma de biopelícula presentan un aumento de la expresión de ciertos genes, muchos de ellos de función desconocida, respecto a las formas planctónicas. Algunos de estos genes se activan en respuesta a situaciones de estrés celular favoreciendo la resistencia bacteriana, a veces a través de la regulación de los QS. Al igual que existe una variedad de ambientes dentro de las biopelículas en cuanto a concentración de nutrientes y oxígeno, también existen diferencias en cuanto a resistencia a antimicrobianos. La exposición a concentraciones subletales de antibiótico provoca la selección de grupos celulares más resistentes a dicho antibiótico (39).

2.7.5. Hipermutación.

Las situaciones de estrés producidas por condiciones fisiológicas y medioambientales adversas, como la disminución de nutrientes o la presencia de antibióticos, pueden incrementar las tasas de mutación de grupos de bacterias. Este estado de hipermutación se llama también mutación adaptativa. Las bacterias obtenidas de biopelículas con alta tasa de mutación mostraron defectos en los sistemas de reparación del ADN. De esta forma, la exposición a un determinado antibiótico, no sólo produce resistencia ante él mismo, sino que también, indirectamente, favorece la resistencia a otros antibióticos (64).

2.7.6. Multicelularidad.

Las bacterias supervivientes del tratamiento de biopelículas con antibióticos permanecen susceptibles a los mismos, indicando que la resistencia en forma de biopelícula no es completamente debida a mutaciones o a la adquisición de genes de resistencia, sino a la persistencia de variantes. Estas células persistentes son las responsables del resurgimiento de la biopelícula cuando el tratamiento ha sido discontinuo o inadecuado. Cuando las biopelículas se exponen a situaciones estresantes, las células persistentes crecen con tasas considerablemente superiores a las de las células mutantes (65).

Como conclusión, consideramos a las biopelículas como organizaciones multicelulares que utilizan una compleja red de transducción de señales para la regulación de la expresión genética y la diferenciación celular. Este comportamiento permite a las bacterias utilizar recursos como el crecimiento

celular, y proporcionar mecanismos de defensa colectiva frente al aclaramiento humoral o celular del huésped y frente a biocidas (56).

2.8. IMPORTANCIA DE LAS BIOPELÍCULAS EN NUESTRO MEDIO.

En las últimas décadas se ha multiplicado la investigación en torno a las biopelículas en el ámbito de las ciencias. Sin embargo, fueron descritas por primera vez hace siglos (66) y han sido muy consideradas en el ámbito industrial. De esta forma, eran bien conocidas por su desarrollo en las conducciones de aire acondicionado, en las tuberías de agua o en los cascos de los barcos (67). Se estima que los gastos derivados del cúmulo de materia orgánica sobre la superficie de los barcos de guerra americanos, alcanzan los 56 millones de dólares al año. Estos gastos son debidos al mayor consumo de combustible por el aumento de la fuerza de rozamiento, y a los gastos de limpieza y tratamiento de las cubiertas de los cascos (68). También son bien conocidos los efectos de las biopelículas sobre sistemas acuáticos como los filtros de agua. Generan metabolitos que influyen en la liberación de calor y en el aumento de la corrosión de metales.

En la industria alimentaria no es deseable la formación de biopelículas sobre la comida o sobre superficies donde se colocan productos alimenticios, tuberías de agua, cuchillos, utensilios para el transporte de comida y otros. Se ha descrito la formación de biopelículas con predominio de bacilos Gram negativos como *Escherichia Coli* o *Salmonella* sobre alimentos o sobre equipos de procesamiento alimentario. Esto puede generar intoxicaciones alimentarias que pueden conllevar serios problemas de salud y pérdidas económicas (69).

Uno de los campos que está en claro desarrollo en todas las especialidades médicas, es el uso de dispositivos médicos sintéticos. El objetivo de estos implantes es el tratamiento de determinadas patologías y el de la mejora de la calidad de vida del paciente. Existen multitud de ejemplos de ello. En el campo de la otorrinolaringología podemos nombrar el uso de implantes cocleares, prótesis osiculares o prótesis vocales, entre otros muchos. El uso de prótesis en pacientes se espera que continúe aumentando, igual que lo hacen esperanza de vida y la demanda de mejoras en la calidad de vida.

Uno de los obstáculos al desarrollo de este tipo de implantes médicos son las complicaciones derivadas de su uso. El desarrollo de biopelículas sobre los implantes se ha relacionado con fenómenos que van desde la pérdida de función con el paso del tiempo al desarrollo de infecciones, que en ocasiones pueden provocar un estado séptico y la muerte del paciente. Una de las especialidades médicas más afectadas por este problema es la Traumatología. En el año 2005 se implantaron 250.000 prótesis de cadera y 500.000 prótesis de rodilla en Estados Unidos. Estos números se esperan que se dupliquen antes del año 2030. Se estima que el 1% de estos pacientes desarrollan una infección que obliga a largos tratamientos antibióticos y, en muchas ocasiones, a la retirada del dispositivo, incrementando los efectos negativos sobre la salud del paciente, los costes del tratamiento, el número de reintervenciones y la estancia hospitalaria (70). En Estados Unidos el coste secundario a las infecciones relacionadas con los implantes médicos se incrementa en más de un billón de dólares al año (71). Las enfermedades mediadas por biopelículas no sólo afectan a la salud del paciente sino también a su percepción física, mental y social.

Otro claro ejemplo lo tenemos en la patología dentaria. La cavidad oral está repleta de biopelículas que colonizan la mucosa y los dientes. Las biopelículas están asociadas con el desarrollo de la enfermedad periodontal, las caries, el desarrollo de apicitis, enfermedades de la pulpa dentaria, fallos de implantes dentales y candidiasis. Los gastos estimados secundarios a las biopelículas orales se han duplicado desde 1997 a 2006, llegando a los 81 billones de dólares. De esta forma se superan los costes de las 5 condiciones médicas más caras recogidas por el "Medical Expenditure Panel Survey": problemas cardíacos (78 billones de dólares), traumatológicos (68,1 billones de dólares), cáncer (57,5 billones de dólares), problemas mentales (57,2 billones de dólares) y pulmonares (51,3 billones de dólares) (58).

2.8.1. Biopelículas y enfermedades en humanos.

Hasta el relativamente reciente descubrimiento de las vacunas y los antibióticos, las sociedades humanas han sido castigadas por enfermedades infecciosas agudas y epidémicas causadas por células planctónicas de patógenos característicos, como el *Vibrio cholerae* y la *Yersinia pestis*. Estas enfermedades han causado alta morbilidad y mortalidad hasta mediados del siglo XX. Los patógenos causantes de estas enfermedades atacan tanto a individuos sanos como a enfermos y tienen un curso rápido. Desde el descubrimiento de la penicilina en 1938, los progresos en el campo de la microbiología, con el desarrollo de vacunas y tratamientos antibióticos contra las formas bacterianas planctónicas, han permitido, en la mayoría de los casos, la desaparición o al menos el control de dichas enfermedades. La buena

respuesta a estos tratamientos eficaces ha hecho que no se hayan implicado a las biopelículas bacterianas como posible causa de estas infecciones agudas.

Conforme se han ido controlando las infecciones epidémicas, una nueva forma de enfermedad ha tomado protagonismo. Se trata de patologías menos agresivas que persisten meses o años y que alternan períodos de quiescencia con períodos de exacerbación aguda. Estas infecciones pueden afectar a individuos sanos, pero sobre todo a pacientes crónicos que, hoy en día, sobreviven a enfermedades graves gracias a los avances médicos. Las infecciones persistentes son un reto actual para la humanidad, ya que millones de vidas y de recursos médicos y sociales se pierden cada año como consecuencia de las mismas (72). Una de las estrategias empleadas por las bacterias patógenas es la formación de biopelículas. Esta estructura actúa a modo de reservorio celular que puede repoblar zonas colonizadas. Aunque pueden afectar a individuos sanos, más de la mitad de las infecciones de enfermos inmunológicamente comprometidos son causadas por estas bacterias habituales en nuestro entorno. *Staphylococcus epidermidis*, presente habitualmente en la piel humana, *Pseudomonas aeruginosa* produciendo neumonías de repetición en pacientes con fibrosis quística, *Escherichia Coli* en infecciones del tracto urinario, *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes tuberculosos, *Streptococcus mutans* en infecciones dentarias, son algunos ejemplos de patologías frecuentes que pueden llegar a producir enfermedades crónicas devastadoras en pacientes inmunocomprometidos. Además, la mayoría de las infecciones nosocomiales son infecciones persistentes por biopelículas (66).

Las infecciones mediadas por biopelículas comparten varias características. Las biopelículas se desarrollan preferentemente sobre superficies inertes y frecuentemente sobre dispositivos médicos y fragmentos de tejido necrótico o hueso secuestrado. También pueden desarrollarse en tejido vivo, como en el caso de las endocarditis. Las biopelículas crecen lentamente en una o varias localizaciones y pueden tardar en producir síntomas (73). Las células bacterianas sésiles liberan antígenos, estimulan la producción de anticuerpos, pero éstos son inefectivos en erradicar las bacterias. Pueden generar complejos inmunes y una respuesta inflamatoria que daña los tejidos circundantes (74). Incluso en individuos con un sistema inmune humoral y celular competente, las biopelículas son raramente eliminadas. La situación incluye una mejoría de los síntomas en relación con los tratamientos antibióticos tradicionales que son capaces de eliminar la liberación de células planctónicas de las biopelículas. Sin embargo, no consiguen erradicar por completo el reservorio de células en forma de biopelícula (75). Por esta razón, y a pesar de diversos ciclos de antibióticos, son típicas las recurrencias en los síntomas, que no cesan hasta que la población sésil es quirúrgicamente extirpada del organismo.

La investigación relacionada con la formación de biopelículas está en continua expansión, por lo que se van añadiendo casi constantemente nuevas patologías y nuevos dispositivos médicos afectados por biopelículas. En la tabla 1.4 se señalan algunas de las enfermedades más relevantes recogidas ya en 1999 por Costerton y cols, y actualizadas posteriormente en 2005 por el mismo grupo (66).

INFECCIÓN/ENFERMEDAD	ESPECIES BACTERIANAS HABITUALES
Caries dental	Cocos gram positivos
Periodontitis	Anaerobios gram negativos orales
Otitis media	<i>Haemophilus influenzae</i>
Amigdalitis crónica	Varias especies
Fibrosis quística-neumonía	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Endocarditis	<i>Streptococcus Viridans</i> , <i>Staphylococcus</i>
Fascitis necrotizante	<i>Streptococcus grupo A</i>
Infecciones musculoesqueléticas	Cocos gram positivo
Osteomielitis	Varias especies
Infecciones vía biliar	Bacterias entéricas
Cálculos renales	Bacilos gram negativos
Prostatitis bacteriana	<i>Escherichia coli</i> y otras bacterias gram negativas.
Infecciones asociadas a cuerpos extraños	Lentes de contacto. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , cocos gram positivos
Suturas	Estafilococo
Neumonía asociada a sistemas de ventilación.	Bacilos gram negativos
Válvulas cardíacas	Estafilococo
Injertos vasculares	Cocos gram positivos
"Shunt" arteriovenoso	Estafilococo
Infecciones Catéteres intravasculares	Estafilococo
"Shunt" espinales	Estafilococo
Peritonitis diálisis peritoneal	Varias especies
Infecciones de catéteres urinarios	<i>Escherichia coli</i> , Bacilos gram negativos
Dispositivos intrauterinos	<i>Actinomyces israelii</i> y otros
Prótesis penélicas	Estafilococo
Melioidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Neumonía-UCI	Bacilos gram negativos
Cerclaje escleral	Cocos gram positivos
Tubos endotraqueales	Variedad de bacterias y hongos
Catéteres Hickman	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Candida albicans</i>
Catéteres centrales	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y otros
Dispositivos traumatológicos	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>

TABLA 1.4. Principales enfermedades relacionadas con biopelículas (Costerton y cols, 2005)

2.8.2. Dispositivos médicos y biopelículas.

La generalización en el uso de dispositivos médicos ha provocado un gran avance en el manejo de muchas enfermedades. Algunos de estos implantes se usan con fines diagnósticos o terapéuticos temporales, como vías venosas, catéteres de drenaje, sondas urinarias y cánulas respiratorias. Otros son dispositivos permanentes utilizados para reemplazar órganos o tejidos dañados, como válvulas cardíacas, prótesis vasculares, prótesis de cadera o rodilla, etc.

Sin embargo, cuando un dispositivo se coloca en contacto con tejidos humanos aunque sólo sea durante unas horas, tiene cierto riesgo de infectarse. Las infecciones repetidas provocan la pérdida de tolerancia a la prótesis y de la función para la que fue diseñada. Los tratamientos habituales basados en antibióticos y antiinflamatorios suelen ser incapaces de eliminar la infección por completo, por lo que con frecuencia la única solución al problema es la retirada del dispositivo. Esto tiene importantes efectos negativos sobre la morbilidad, mortalidad y el gasto económico.

Las ventajas de los implantes utilizados hoy día en Medicina, junto al aumento de la expectativa de vida, hacen previsible un mayor uso futuro, lo que provocará un incremento en el número de complicaciones relacionadas con los dispositivos implantados.

Las biopelículas fueron reconocidas como las causantes de infecciones de dispositivos médicos en los primeros años de la década de los noventa, al examinar bajo el microscopio electrónico dispositivos extraídos por infección de los mismos.

El proceso habitual es similar en todos los casos y puede resumirse con la siguiente secuencia: inicialmente se forman biopelículas sobre la superficie inerte o sobre tejidos necróticos. Se produce el lento crecimiento de las mismas y la aparición retrasada de los síntomas; posteriormente, el sistema inmune del huésped no es capaz de resolver la infección, se produce la liberación de células planctónicas y, finalmente, el tratamiento de la infección activa con antibióticos consigue detener los síntomas, pero no erradicar por completo las biopelículas maduras, las cuales pueden provocar nuevos brotes infecciosos agudos (66).

2.8.2.1. Magnitud de las infecciones de los dispositivos médicos.

En el año 2001 se pusieron en Estados Unidos más de cuarenta millones de implantes, con una tasa de infección de entre el 1% y el 50%. Sin embargo, a pesar de los problemas antes descritos, los beneficios sanitarios de las prótesis sintéticas son innegables, por lo que se estima que su uso continuará aumentando (39).

2.8.2.2. Mecanismos de infección.

Los mecanismos a través de los cuales los microorganismos anclados a los dispositivos médicos provocan una infección en el huésped, no son comprendidos en su totalidad. Tres son los mecanismos implicados: la liberación de células bacterianas procedentes de las biopelículas maduras, producción y liberación de endotoxinas y, por último, la resistencia al sistema inmune del huésped.

En la tabla 1.1 se describen algunos de los dispositivos más utilizados en medicina y las bacterias que habitualmente los colonizan.

2.8.3. Biopelículas y enfermedades otorrinolaringológicas.

Las infecciones observadas en la práctica clínica en el área otorrinolaringológica (ORL) son, en cierta forma y cada vez más, resistentes a los tratamientos habituales. La rinosinusitis crónica, otitis media crónica o amigdalitis de repetición y algunas otras infecciones del área ORL, son entidades crónicas en las que los tratamientos antibióticos a menudo fracasan, afectando a la calidad de vida del paciente. Aunque este efecto puede ser en parte influenciado por el desarrollo de resistencias bacterianas, secundario al abuso de los tratamientos antibióticos, la formación de biopelículas debe ser tenido en cuenta como otro posible factor etiológico.

El desarrollo de la teoría de las biopelículas ha provocado un cambio en el concepto de las infecciones en el ámbito de la otorrinolaringología. La cavidad oral, la faringe, las fosas y senos paranasales, el oído externo y medio son, de un modo u otro, cavidades abiertas al exterior y colonizadas por millones de bacterias. Las infecciones bacterianas y fúngicas en estas zonas son relativamente frecuentes. Con frecuencia se trata de infecciones crónicas con exacerbaciones frecuentes que ceden temporalmente con antibióticos.

2.8.3.1. Enfermedades del oído.

Aunque la mayoría de las secreciones que se obtienen de pacientes con otitis media aguda (OMA) presentan cultivos positivos para las bacterias habituales, tan sólo el 30% de las secreciones de la otitis media serosa (OMS) lo son. Esta diferencia en los resultados microbiológicos llevó inicialmente a la conclusión de que la otitis media serosa (OMS) era un problema inflamatorio. Sin embargo, a finales de los 90 surgieron diversas evidencias de que la OMS podría estar mediada por biopelículas, como la detección de ADN y ARN mensajero mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (76), o la detección de endotoxinas bacterianas en oídos de pacientes con OMS (77). Posteriormente, se describió la presencia de biopelículas en la mucosa de pacientes con otitis media crónica y OMS (37). También se han descrito biopelículas en pacientes con otitis media recurrente durante el período de tiempo entre dos episodios agudos. Este hallazgo apoya la teoría de la persistencia de reservorios bacterianos en forma de biopelícula.

La teoría de las biopelículas explica la dificultad en el cultivo de las secreciones de la OMS y la ineficacia de los tratamientos antimicrobianos. El tratamiento más efectivo es la colocación de drenajes transtimpánicos (DTT), ya que restauran la ventilación del oído medio en los oídos con mala función tubárica. Los oídos hipoventilados son un medio excelente para el desarrollo de biopelículas (56).

Por ello, la demostración de biopelículas en la mucosa de pacientes con otitis media serosa apoya la teoría infecciosa de la otitis serosa. De esta forma, podemos englobar a la otitis media serosa dentro de una secuencia de fases que se producen en pacientes con disfunción tubárica. La escasa ventilación de

la cavidad timpánica genera una hipopresión mantenida en la cavidad del oído medio. Se produce la secreción de moco que no se reabsorbe y acaba infectándose mediante bacterias que ascienden a través de la trompa de Eustaquio. Tras la resolución de la infección aguda permanecería un reservorio celular en forma de biopelícula en la mucosa del oído medio, responsable de la detección de material genético y de mediadores de la inflamación en pacientes con otitis media serosa. Estas colonias bacterianas quedarían en estado quiescente pero en un momento dado podrían reactivarse y generar episodios repetidos de otitis media aguda.

Los cultivos tradicionales se han mostrado con frecuencia inadecuados para la detección de bacterias viables en la OMS y en la otitis media crónica simple (OMC).

Las frecuentes supuraciones que se ven en pacientes con otitis media crónica colestomatosa (OMCC) también se asocian a biopelículas. Los microorganismos aislados en cultivos de estos pacientes, como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, son cepas bacterianas conocidas por su capacidad para formar biopelículas. Además, la queratina de la matriz del colesteatoma parece un sustrato ideal para el desarrollo de colonias bacterianas. De esta forma, se han descrito biopelículas asociadas firmemente a los queratinocitos del colesteatoma (78). Así, la persistencia y recurrencia de las infecciones, típicas de los colesteatomas, pueden explicarse por la formación de biopelículas, siendo la erradicación quirúrgica de la enfermedad el único tratamiento definitivo.

2.8.3.2. Enfermedades de las fosas nasales.

La incidencia de sinusitis crónica está creciendo, obligando a largos tratamientos antibióticos de semanas o meses que, con frecuencia, resultan inefectivos para la erradicación de la enfermedad. Se ha demostrado la presencia de biopelículas en muestras de mucosa nasal obtenidas durante la cirugía endoscópica nasosinusal (CENS) realizada para la erradicación de la patología infecciosa-inflamatoria. Experimentalmente, también se han descrito biopelículas en senos paranasales de animales de experimentación a los que se les inoculaba previamente *Pseudomonas aeruginosa* (79).

2.8.3.3. Enfermedades de la faringe.

El tejido adenoideo resecado de niños con sinusitis crónica y pacientes con otitis media también ha mostrado una gran colonización en comparación con tejido adenoideo de niños operados por problemas de apnea del sueño, lo que apoya la teoría de que las adenoides actúan a modo de reservorio bacteriano en la nasofaringe. La resección del tejido adenoideo en estos pacientes disminuye los episodios infecciosos en el área ORL, especialmente durante la edad pediátrica (80).

La presencia de biopelículas en el interior de las criptas amigdalares puede explicar la cronicidad y recurrencia de algunos pacientes con amigdalitis de repetición. Los tratamientos médicos son útiles contra la infección aguda pero no previenen las recurrencias, al ser incapaces de erradicar las formas sésiles bacterianas. Las amígdalas extirpadas por motivos no infecciosos, como las de los pacientes intervenidos por síndrome de apnea del sueño, han mostrado colonizaciones por biopelículas significativamente menores (81,82).

2.8.3.4. Biopelículas en implantes médicos en ORL.

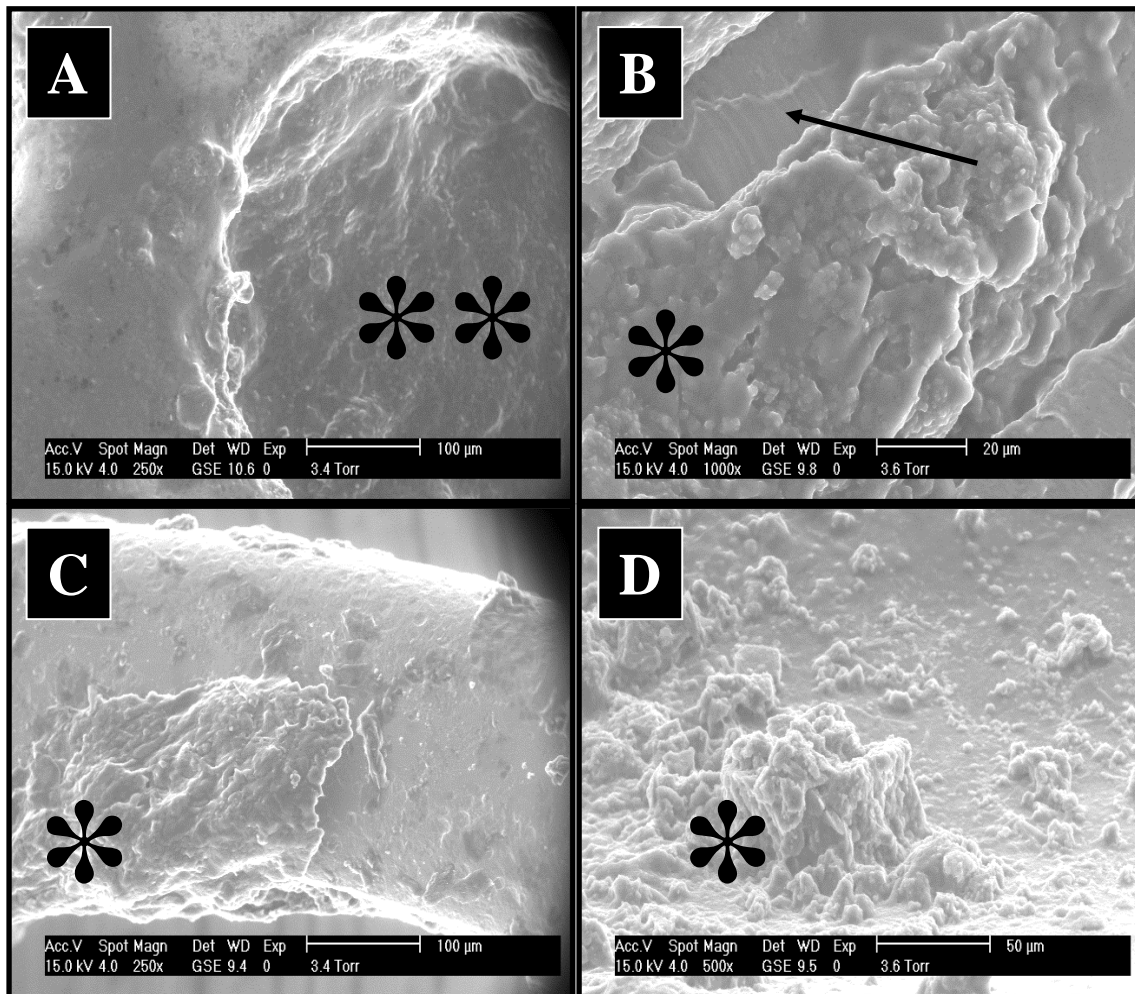


Figura 1.2 Colonización de biopelículas en implantes otorrinolaringológicos. Imágenes tomadas mediante Microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA) en las que se observa un drenaje transtimpánico de titanio (figuras A y B) extraído de un paciente que presentaba otorreas de repetición. Puede observarse la luz del DTT bloqueada por biopelículas bacterianas (**). En la figura B se observa una colonia bacteriana madura (*) sobre la superficie relativamente lisa de titanio que conforma el DTT (flecha). Prótesis total de reemplazo osicular (TORP) de titanio extruido cubierto parcialmente por biopelículas (*) (Figura C). Biopelículas (*) colonizando la superficie lisa del interior de una prótesis nasolacrimal extraída por persistencia de la epifora.

Las infecciones refractarias de pacientes portadores de drenajes transtimpánicos o de otros dispositivos que se usan en el oído, como los implantes cocleares o las prótesis de reemplazo osicular, han sido relacionados

con infecciones por biopelículas (Figura 1.1.). Se ha descrito la existencia de otorrea tras la colocación de DTT en niños con la presencia de biopelículas (83). También se ha relacionado la colonización por biopelículas con la extrusión o la presencia de infecciones recidivantes que obligan al recambio de implantes cocleares (84).

De la misma manera, se han descrito recientemente biopelículas que colonizan la superficie de prótesis y sondas lagrimales usadas para el tratamiento de la epífora, y se han relacionado los pobres resultados de las mismas y las frecuentes obstrucciones que presentan con la colonización por biopelículas bacterianas (85). La presencia de biopelículas en prótesis vocales, tubos endotraqueales o las cánulas de traqueotomía, sugieren una relación directa con el desarrollo de infecciones respiratorias y neumonías en los pacientes que utilizan este tipo de dispositivos (56,86).

2.9. CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS.

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE BIOPELÍCULAS.
1 Técnicas microbiológicas clásicas. Cultivos celulares.
2 Técnicas moleculares.
- RCP.
- Técnica de "Photorhabdus luminescens lux operon".
3 Técnicas de imagen de alta resolución.
- MET.
- MEB.
- MEBA.
- MCLB.

TABLA 1.5 Métodos de detección de biopelículas bacterianas. RCP (Reacción en cadena de la polimerasa), MET (Microscopio electrónico de transmisión), MEB (Microscopio electrónico de barrido), MEBA (Microscopio electrónico de barrido ambiental), MCLB (Microscopio confocal láser de barrido).

En la práctica clínica diaria, el cultivo se ha convertido en el método de elección para la caracterización microbiológica. Las torundas, aspiración con aguja, los exudados y la toma de biopsia son los métodos primarios para la obtención de muestras destinadas al cultivo en placas en la mayoría de las infecciones. Aunque la tinción Gram puede estar disponible en menos de una hora, la información más valiosa del cultivo no está disponible hasta los 2-3 días y puede llevar más de una semana la determinación de la sensibilidad a antibióticos.

El cultivo microbiológico, usado como técnica diagnóstica y como herramienta de investigación, presenta varios inconvenientes: no determina la distribución espacial de las bacterias, no proporciona una evaluación precisa de la infección (71), retrasa la identificación de los organismos y es un método

inexacto, especialmente en infecciones bacterianas mixtas y en las infecciones mediadas por biopelículas. Las técnicas de cultivo tradicionales están diseñadas para la detección de las formas planctónicas que crecen fácilmente en las condiciones del laboratorio. Así lo demuestran trabajos como el de Trampuz y cols. que mostró un mayor número de cultivos positivos tras inducir la liberación de bacterias planctónicas a partir de biopelículas, aplicando ultrasonido sobre prótesis ortopédicas (87). Además, los cultivos microbiológicos clásicos pueden mostrar el crecimiento de bacterias que no juegan un papel principal en determinadas patologías. Para obtener resultados más precisos, se necesitaría procesar las muestras para destruir los polisacáridos que envuelven a los microorganismos y así liberarlos.

Por ello se han desarrollado nuevos métodos para la caracterización de las biopelículas. Podemos dividirlos en dos grandes grupos:

2.9.1. Técnicas moleculares.

Las técnicas moleculares se encuentran en desarrollo y, hasta ahora, se utilizan a nivel experimental y no clínico. Es de esperar que, con el tiempo, acaben por utilizarse en la práctica hospitalaria.

2.9.1.1. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

La técnica molecular más utilizada está basada en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Estas técnicas requieren, en primer lugar, la extracción del ácido nucleico de la muestra.

El uso de la RCP tradicional presenta dos inconvenientes fundamentales para el estudio de biopelículas. En primer lugar, la utilización de secuencias

cebadoras ("primers") específicas limitan los resultados, especialmente cuando se trata de infecciones polimicrobianas. Además el método clásico no permite cuantificar el número de copias de una muestra.

La RCP cuantitativa permite medir en tiempo real el número de copias amplificadas. Incluso, pueden utilizarse marcadores que identifiquen resistencia a diversas clases de antibióticos. El uso de esta tecnología en distintos estudios demuestra que muchas biopelículas son viables pero no cultivables mediante las técnicas tradicionales.

LA RCP múltiple es una nueva técnica disponible por el momento en el ámbito investigador. Proporciona un preciso y rápido análisis de las bacterias en menos de 6 horas. El ADN bacteriano o fúngico es amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa y valorada mediante espectroscopia de masas por ionización. La amplificación utiliza cebadores del ADN 16S. Los cebadores pueden variar para detectar genes de resistencia antibiótica, infección por hongos u otros. Todo el ADN bacteriano es amplificado, no sólo el ADN de los microorganismos sospechados, a diferencia de los cultivos o de la RCP clásica. A través de un algoritmo matemático se determina el peso molecular de los nucleótidos que es posteriormente comparado con una base de datos para identificar el microorganismo.

En el caso de microorganismos no registrados anteriormente en la base de datos, el propio sistema identifica a qué bacteria o grupo de bacterias se parece más. Tiene una elevada sensibilidad en la detección de todos los organismos con una población mayor del 1% dentro de la muestra. Además permite identificar hongos y virus e incluso genes de resistencia a antibióticos.

Para hacer más práctica la técnica se pueden utilizar únicamente los cebadores que permitirán detectar un grupo de bacterias, las más prevalentes en la patología que se esté estudiando.

A diferencia de los cultivos tradicionales, esta técnica moderna emplea horas en obtener un diagnóstico preciso, por lo que es de esperar que sea una técnica ideal para su aplicación clínica. Ya ha sido una herramienta utilizada en contra del bioterrorismo, para detectar subtipos de patógenos y la emergencia de nuevas especies, así como para calcular la carga viral tras las vacunaciones (68,88,89).

2.9.1.2. Técnica de "Photorhabdus luminescens lux operon".

Otra técnica menos usada consiste en la introducción de un "Photorhabdus luminescens lux operon" en el cromosoma bacteriano. La bacteria emite luz a 486nm durante la respiración bacteriana. La cantidad de fotones emitidos determina la cantidad de bacteria presente. Para ello es necesario el uso de una cámara que contabiliza fotones y que transmite la luminiscencia registrada en una imagen en escala de grises. Tiene una alta correlación con cultivos cuantitativos pero son más representativos que éstos, ya que valoran la infección en su totalidad y no únicamente pequeñas zonas. Este método también ha proporcionado una visión de la distribución espacial de la bacteria (90,91).

2.9.2. Técnicas de imagen de alta resolución.

Aunque la microscopía óptica permite la visualización de las biopelículas, se requieren técnicas de alta resolución para el estudio detallado de la estructura celular y el glucocálix. Las técnicas de microscopía electrónica ofrecen una visión detallada de la estructura de las biopelículas proporcionando información complementaria dependiendo del método utilizado.

2.9.2.1. Microscopio electrónico de transmisión (MET).

El MET fue, desde su inicio, utilizado en el campo de la metalurgia (para visualización de la estructura molecular de cristales y metales) y en las ciencias médicas.

Funcionamiento.

De forma simplificada, el funcionamiento del MET se basa en la generación de un haz de electrones que interactúa con la muestra a estudiar. Sólo aquellos electrones que atraviesan la muestra golpean una pantalla fosforescente convirtiéndose en una imagen. Las áreas oscuras de la imagen corresponden a zonas de la muestra donde sólo unos pocos electrones son capaces de atravesarla. Las zonas claras son áreas de la muestra que son atravesadas por el haz de electrones sin mucha dificultad. Por lo tanto la imagen final ofrece un contraste de escala de grises que proporciona una imagen detallada, por ejemplo de la estructura celular.

Procesamiento.

El MET es la técnica microscópica electrónica de elección para el estudio de cortes ultrafinos. El procesamiento de las muestras biológicas a estudiar incluye la deshidratación con soluciones de acetona o alcohol, la inclusión en resinas acrílicas, el recubrimiento con materiales metálicos para mejorar la conducción eléctrica de la muestra y la realización de cortes finos. Además, las muestras deben colocarse en una cámara de vacío para su examen. Este método relativamente complejo, requiere cierta manipulación por parte del investigador, por lo que se requiere experiencia. Este proceso facilita la introducción de artefactos de forma inadvertida. Es decir, la muestra que pretendemos examinar puede sufrir modificaciones, limitando la capacidad de observar tejidos biológicos en su estado natural (92).

Utilidad para estudio de biopelículas.

En el campo de las biopelículas, proporciona imágenes muy detalladas de la estructura celular, alcanzando resoluciones del orden del nanómetro y una magnificación de 100.000x. Sin embargo, el procesamiento de la muestra implica una deshidratación y destrucción de la mayor parte de la biopelícula madura.

2.9.2.2. Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Funcionamiento.

El MEB utiliza un haz de electrones de alta energía para generar una variedad de señales de la superficie de muestras sólidas. Proporciona información de la morfología externa y textura de la muestra, composición química y orientación de los materiales que la componen. Los datos obtenidos corresponden a una pequeña área de la muestra seleccionada, proporcionando una imagen en dos dimensiones con apariencia tridimensional.

Procesamiento

La preparación de la muestra puede ser mínima o muy elaborada, en función de la naturaleza de la misma. En el caso de los tejidos biológicos se necesitan muestras pequeñas, ajustadas al tamaño de la cámara de vacío. Es necesario deshidratar el material a estudiar y prevenir la adquisición de carga en aquellas muestras que se comporten como aislantes. La mayor parte de los materiales aislantes son recubiertos con una fina capa de material conductor, generalmente carbón, oro u otros metales o aleaciones. La elección del material conductor depende del objetivo del estudio: el carbón es preferible si se va a realizar un análisis elemental, mientras que los metales son más efectivos para obtener imágenes de microscopía electrónica de alta resolución.

Al igual que en el MET, este procesamiento de las muestras puede provocar la alteración de las mismas.

Utilidad para estudio de biopelículas.

La principal utilidad del MEB es su validez para cualquier campo en el que se requiere el estudio morfológico de la superficie de materiales sólidos. Esta característica lo hace especialmente útil en geología y en el ámbito industrial. EL MEB es una herramienta disponible para el estudio de muestras biológicas, siempre que se realice la deshidratación y la metalización de las mismas. Se pueden visualizar áreas entre 1 centímetro y 5 micras con una magnificación desde 20x a 30.000x y una resolución de entre 50 y 100 nanómetros.

El MEB es también capaz de realizar análisis de localizaciones seleccionadas. Esta característica es especialmente útil en la determinación química cuantitativa y cualitativa (93).

El principal inconveniente es que el procesamiento de la muestra facilita la introducción de artefactos. Además, durante el proceso de deshidratación de la muestra, la matriz extracelular, que juega un papel fundamental en la resistencia bacteriana y que está formada mayoritariamente por agua, queda dañada.

2.9.2.3. Microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA).

Funcionamiento.

El MEBA se basa en la introducción de una serie de variaciones respecto al MEB convencional, fundamentalmente la introducción de un sistema de bombeo diferencial, de un sistema de aperturas restrictivas de presión ("pressure limiting apertures") y de nuevos sistemas de detección de

electrones. La muestra se coloca en una cámara envuelta en vapor de agua que es sometida a bajo vacío.

El sistema de detección utilizado en el MEBA incluye un diseño óptimo de los detectores de electrones dispersos que permite mejorar la señal, incluso a las más altas presiones utilizadas. Además, se incluye un nuevo sistema de detección de electrones secundarios. Los electrones secundarios producidos por la interacción del haz de rayos y la muestra son acelerados en el gas. Estos electrones colisionan con las moléculas de gas liberando nuevos electrones. Este proceso se repite muchas veces proporcionando una amplificación de los electrones secundarios. Las colisiones de los electrones en el gas también producen excitación y emisión de fotones en forma de avalancha, que es usado por los detectores para amplificar la señal.

Procesamiento.

El MEBA permite el estudio de cualquier muestra, húmeda o seca, aislante o conductora, biológica o inorgánica, tratada previamente o no; y lo hace en condiciones muy similares a su estado natural. No requiere procesamiento alguno, por lo que las muestras pueden ser estudiadas directamente a continuación de la extracción de las mismas, sin el riesgo de ser modificadas.

La metalización de la muestra, con el objetivo de suprimir la acumulación de cargas que habitualmente se realiza en otros procedimientos de microscopía electrónica, no es necesaria, porque el gas que envuelve la muestra se ioniza y evita la acumulación de cargas. La metalización de

materiales o tejidos no conductores dificulta la visualización detallada de la superficie de la muestra.

Utilidad para estudio de biopelículas.

Las principales aplicaciones del MEBA incluyen la nanotecnología y la microingeniería. La física, química, biología y la tecnología industrial pueden beneficiarse de la utilización del MEBA. Se puede decir que la aparición del MEBA, después de varias décadas de microscopía electrónica convencional, ha supuesto la siguiente gran revolución en microscopía, tras el desarrollo del MEB.

La posibilidad de estudiar tejidos biológicos de forma directa, sin procesamiento alguno, unido a la alta resolución del microscopio, hace que sea una técnica ideal para el estudio de biopelículas. Además tiene la ventaja de poder estudiar procesos dinámicos. Variando la presión en la cámara de la muestra se pueden visualizar los cambios que se producen en el grado de hidratación del tejido biológico, de forma similar a lo que ocurre en la naturaleza.

Se trata de una técnica de imagen de alta resolución que permite ver muestras hidratadas, por lo tanto es una técnica ideal para el estudio del glucocálix que envuelve la biopelícula, especialmente rico en agua y factor decisivo en la resistencia bacteriana.

La capacidad que tiene de estudiar casi cualquier tipo de material, vivo o inerte, hace que sea una técnica muy útil para el estudio de biopelículas y prótesis sintéticas usadas en Medicina (94).

2.9.2.4. Microscopio confocal láser de barrido (MCLB).

Funcionamiento.

El MCLB es un microscopio de fluorescencia de alta resolución. Crea un plano fino en foco, de aproximadamente 3 micras, bloqueando la luz fuera de foco usando barreras ópticas (pinholes). Un haz de luz láser escanea la muestra proporcionando energía que excita la misma tanto en intensidad como en profundidad. Como consecuencia, los fluoróforos intrínsecos de la muestra o sondas exógenas como anticuerpos marcados fluorescentes, son excitados, emitiendo fluorescencia. La recepción de la misma es transformada en imagen digital. Un grupo de cortes ópticos digitales en el eje XY son recogidos automáticamente a través del control informático en la dimensión Z. También pueden realizarse cortes sagitales, en el plano XZ. Este grupo de imágenes puede ser procesado mediante un ordenador para crear una reconstrucción tridimensional.

Procesamiento.

Una de las ventajas del MCLB es que en la mayoría de los casos sólo es necesario un mínimo procesamiento. De esta forma la posibilidad de introducir artefactos o de dañar la muestra es mínima. Es posible observar biopelículas vivas, en su estado natural. En la mayoría de los casos se realizan tinciones con distintos fluoróforos, en función de la información buscada. De esta forma, utilizando anticuerpos marcados específicos contra una determinada estructura bacteriana, se puede identificar la bacteria que forma parte de la biopelícula. También existen varios preparados comerciales fluorescentes que diferencian bacterias en función de la integridad de la membrana celular bacteriana. Este

método requiere un rápido procesamiento de unos pocos minutos y permite, sin necesidad de esperar al resultado de los cultivos microbiológicos, distinguir células bacterianas vivas y muertas.

Aunque el MCLB permite el examen directo de biopelículas intactas, en algunos casos puede ser necesaria la congelación de la muestra o su inclusión en resina para realizar cortes finos. De esta forma la muestra gana en robustez y son más manejables.

Utilidad para estudio de biopelículas.

El MCLB es una de las técnicas de alta resolución más utilizadas hoy día en la investigación en biopelículas. Las principales ventajas para el estudio de biopelículas incluyen, en primer lugar, la posibilidad de realizar estudios directos tras la recogida de muestras, realizando un mínimo procesamiento, y por tanto sin un gran riesgo de variar el estado natural de la misma. En segundo lugar, el MCLB trabaja realizando multitud de secciones ópticas de la biopelícula y con la posibilidad de realizar posteriormente reconstrucciones tridimensionales, por lo que proporciona imágenes de todo el espesor de la colonia. Además y utilizando las tinciones adecuadas es posible determinar especies bacterianas o la viabilidad bacteriana (95).

La principal desventaja de esta técnica es que no proporciona imágenes de la matriz extracelular, al no existir marcadores eficientes para ello. Con las técnicas actuales sólo puede visualizarse la superficie celular que compone la biopelícula.

3. MODELOS ANIMALES DE BIOPELÍCULAS EN OÍDO MEDIO.

3.1. MODELOS EXPERIMENTALES DE BIOPELÍCULAS EN OÍDO MEDIO.

Existen varios modelos de biopelículas en otitis media en la literatura científica en lengua inglesa que han sido publicados en los últimos años.

3.1.1. Modelos experimentales en chinchilla.

3.1.1.1. *Haemophilus influenzae* (96).

Este modelo fue publicado por JC. Post en el año 2001 (97), basándose en un modelo previo de otitis media en chinchilla (98,99). De forma simplificada, el procedimiento consiste en la inoculación directa bacteriana en la bulla timpánica de la chinchilla utilizando una jeringuilla de insulina. La solución de *Haemophilus influenzae* empleada fue una cepa aislada del oído medio de un niño con otitis. El procedimiento fue realizado tras la administración de una solución anestésica intramuscular. Las chinchillas inoculadas fueron sacrificadas a distintos tiempos con el objeto de visualizar biopelículas en diferentes momentos de evolución. Las muestras fueron recogidas tras el sacrificio del animal, embebidas en un material plástico y posteriormente metalizadas para su correcta visualización con MEB.

El mismo grupo que describió el modelo en chinchilla realizó un trabajo similar en el año 2002, utilizando el microscopio confocal y usando tinciones con fluoróforos para diferenciar células con membrana celular dañada, de aquellas que presentaban membranas celulares intactas. De esta forma, fueron capaces de confirmar la viabilidad de las bacterias que conforman las biopelículas en este modelo experimental (96).

3.1.1.2. Inoculación nasal de *Streptococcus Pneumoniae* (100).

Basado en un modelo experimental de otitis media (101), consiste en la inoculación por vía nasal de una solución de virus Influenza A/Alaska/6/77 (H3N2). A continuación inoculaban, por la misma vía, una solución de *Streptococcus Pneumoniae* previamente aislada del oído de un paciente con otitis media. La administración de la solución viral antes que la bacteriana pretendía aumentar la severidad de la otitis media y favorecer la colonización bacteriana a nivel de la nasofaringe (102). Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos de incubación. Las muestras obtenidas procedentes de la mucosa del oído medio y de la nasofaringe fueron procesadas para su estudio con MEB.

3.1.2. Modelo experimental en primate.

Desarrollan un modelo de biopelículas en monos cynomolgus (especie *Macaca fascicularis*) en los que se provoca una otitis media crónica, de forma análoga al modelo de otitis media crónica en monos descrito por el mismo grupo (103,104). Para ello realizan una perforación de la membrana timpánica e inoculaciones repetidas de una solución de *Pseudomonas aeruginosa* (PITT27853), conocida por su capacidad para la formación de biopelículas. Al finalizar el estudio se procede al lavado de los oídos con el objetivo de eliminar las bacterias planctónicas flotantes. Se toman muestras de mucosa para el estudio con MEB y así determinar la presencia o no de biopelículas. Las imágenes de MEB demostraron la existencia de biopelículas sobre la mucosa del oído medio (105).

3.1.3. Modelo experimental en rata.

3.1.3.1. *Streptococcus pneumoniae* intratimpánico.

Publicado en lengua china, estudian la existencia de biopelículas bacterianas en ratas mediante MEB, MCLB con inmunofluorescencia y microscopía óptica. Utilizan una solución de *Streptococcus Pneumoniae*. La inoculación bacteriana se realiza mediante inyección en la bulla timpánica. El sacrificio de los animales con tiempos de incubación diferentes mostró un predominio de agregados bacterianos a los 1-3 días de la inoculación, biopelículas maduras dispersas en forma de torre a los 5-7 días y una recesión en el número de biopelículas tras el período inflamatorio inicial (10 a 14 días) (106).

3.1.3.2. *Streptococcus pneumoniae* vía nasal (107).

Realizado en 8 ratas Sprague-Dawley, consiste en la inoculación por vía nasal de una solución de *Streptococcus pneumoniae* ST 556 procesada junto con una solución de metilcelulosa, para mejorar la adhesión bacteriana al epitelio nasofaríngeo. El procedimiento es realizado bajo anestesia general por vía intraperitoneal. Cada rata recibe una inoculación bacteriana mediante una cánula nasal cada 4-7 días durante 7 meses como máximo. Tras cada una de las inoculaciones, la rata es colocada en una cámara de presión, en posición de decúbito supino, y sometida a un aumento de la presión controlada, para favorecer el paso de bacterias hacia el oído medio. Los animales fueron sacrificados en distintos tiempos. Se realizaron cortes histológicos con hematoxilina y eosina para determinar la presencia de biopelículas. Tan sólo

las dos últimas ratas del estudio, sacrificadas a los 7 meses, mostraron la presencia de colonias bacterianas sobre la membrana timpánica.

II OBJETIVOS.

II. OBJETIVOS.

Los objetivos iniciales de este trabajo fueron los siguientes:

- 1.- Creación de un modelo experimental de biopelículas en el oído medio de rata Wistar, basado en un modelo previamente validado de otitis media crónica, mediante la inoculación de *Pseudomonas aeruginosa* y cauterización de la trompa de Eustaquio.
- 2.- Estudio cronológico y topográfico del desarrollo de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el sacrificio de los animales de experimentación en distintos tiempos de evolución.
- 3.- Análisis de la aplicabilidad del modelo experimental para el estudio de las interacciones entre biomateriales y los tejidos del oído medio colonizados por biopelículas.
- 4.- Análisis de la colonización por biopelículas del titanio y la hidroxiapatita, como biomateriales más utilizados en el tratamiento de patología otológica, tras la inoculación de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 5.- Estudiar la utilidad del microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA) como método no sólo de detección, sino de análisis específico del glucocálix, estructura protectora de las bacterias organizadas en biopelículas y principal responsable de la resistencia frente a antimicrobianos.
- 6.- Comparar la utilidad del MEBA frente a otros medios de detección y estudio de biopelículas como la microscopía confocal láser de barrido y la microscopía electrónica de barrido y de transmisión convencionales.

III MATERIAL Y MÉTODOS.

III MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

El animal utilizado para desarrollar este estudio fue la rata Wistar. Las ratas fueron obtenidas del animalario del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Puerta de Hierro. La mayor parte de los animales fueron obtenidos de la antigua sede del hospital en Madrid, y algunos casos de la nueva sede de Majadahonda. Posteriormente, hasta el momento fijado para el sacrificio del animal, las ratas inoculadas permanecieron en jaulas separadas extremándose las condiciones de limpieza de las mismas, y dentro de una estancia de flujo laminar cruzado en el animalario del mismo centro. Estas condiciones permiten disminuir la posibilidad de otitis media espontánea o el contagio entre animales.

El sacrificio y la toma de muestras fueron realizados en el quirófano experimental del Hospital Universitario Puerta de Hierro en condiciones de esterilidad.

Se utilizaron ratas hembras sanas, con un peso inicial de 120 a 200 gramos, que no presentaban datos de haber tenido patología otológica. Para ello se desecharon aquellos animales que no presentaban una otoscopia, palpación cervical y exploración vestibular normales, según el método detallado en el apartado 3.7.1., y aquellas en las que se observó fibrosis de la pared ósea durante el procedimiento quirúrgico. De esta forma, se intentaban detectar y descartar aquellas ratas que pudieran haber tenido episodios de otitis espontáneas previas. La incidencia de otitis espontánea en ratas estabuladas es elevada, en torno al 20%. Controlando las condiciones de manipulación y

manteniéndolas en unidades aisladas, la incidencia se limita al 5% aproximadamente (108).

La manipulación a la que fueron sometidos los animales se realizó de acuerdo con las normas sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos recogidos en el RD 1201/2005 (BOE número 252, 21 octubre de 2005) y en la Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y el Consejo de 22 de julio de 2003.

3.2. BACTERIA EMPLEADA.

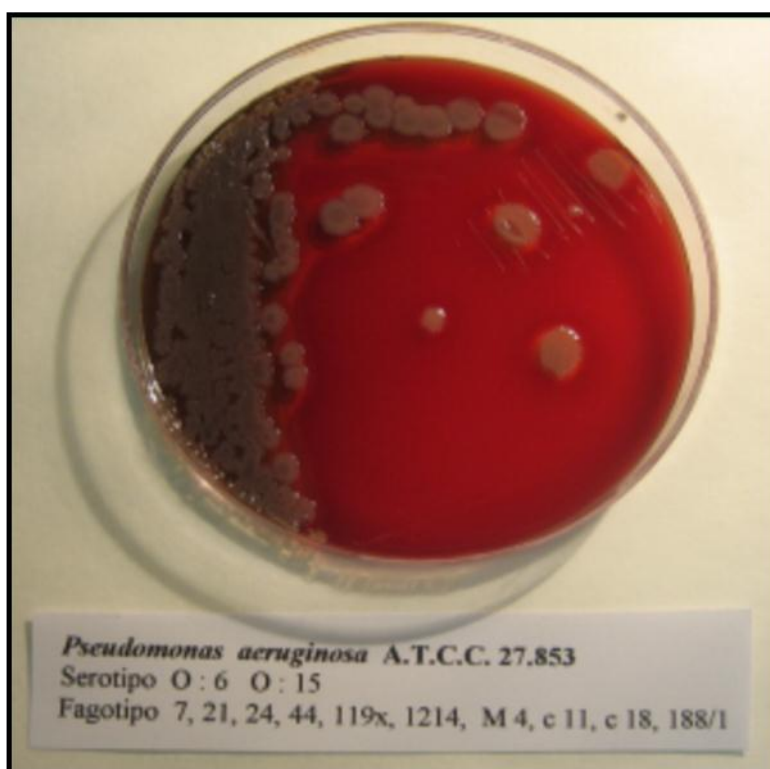


Figura 3.1 Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en placa agar sangre de carnero al 5%.

La bacteria empleada fue la cepa de referencia 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* de la *American Type Culture Collection* (ATCC)

(BBL®QualitySwab™, Becton Dickinson). Es una preparación estabilizada de bacterias vivas que permanecen inalteradas durante largos periodos de tiempo, evitando los inconvenientes de los cultivos repetidos (mutación, contaminación y pérdida de viabilidad).

3.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

La preparación del inóculo consistía en la realización de una suspensión de *Pseudomonas aeruginosa* con una concentración de 500 millones de bacterias por mililitro de suero salino fisiológico unos minutos antes de la inoculación.

Para lograr la concentración bacteriana señalada se sembraba la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en una placa de agar sangre de carnero al 5% (BioMérieux®), y se incubaba durante 18-24 horas a 37°C en atmósfera aerobia. Utilizando como referencia el tubo número 2 de la escala de Mc Farland, que tiene una densidad aproximada a la obtenida con una concentración de bacterias bacilares de 600 millones por mililitro (6×10^8 /ml), y mediante la correspondiente dilución con suero salino fisiológico (1.66 mililitros de la suspensión bacteriana y 1.66 mililitros de suero salino fisiológico), se lograba una suspensión con una concentración bacteriana de 500 millones de bacterias por mililitro.

La nueva solución bacteriana se mantenía refrigerada en nevera entre 2 y 6°C de temperatura hasta la inoculación, con el objetivo de limitar los cambios en la concentración bacteriana. Para la inoculación se utilizó una micropipeta Hamilton estéril. Se inoculaba un volumen de la solución bacteriana suficiente

para el llenado completo de la cavidad timpánica, que resultó ser en torno a los 50 microlitros (0.05 mililitros) en todos los casos.

3.4. BIOMATERIALES.

3.4.1. Titanio.

Se utilizaron fragmentos obtenidos a partir de prótesis de titanio, utilizadas cada vez más en otorrinolaringología. Para ello se emplearon prótesis nuevas “Titanium ASTM F67 total ossicular replacement prosthesis (TORP)” (Kurz Medical, Inc.R) que fueron cortadas en pequeños fragmentos de un milímetro aproximadamente y esterilizados de forma individual para su posterior utilización.

3.4.2. Hidroxiapatita.

Al igual que en el caso del Titanio, se empleó hidroxiapatita obtenida de prótesis utilizadas en cirugía reconstructiva otológica en humanos (Gyrus ENT LLC. Bartlett, TN, EEUU). Se obtuvieron fragmentos de aproximadamente un milímetro de longitud que posteriormente fueron esterilizados de forma individual para su uso.

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.5.1. Modelo de formación de biopelículas en oído medio de rata.

Se empleó un modelo previo de otitis media que consiguió desarrollar otitis media subaguda en el 100% de las ratas inoculadas (109). Para el desarrollo del modelo de formación de biopelículas se inyectaba una solución bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* en el oído medio de la rata, a través

de un abordaje cervical de oído medio, con el fin de conocer si dicho modelo de otitis media era también adecuado para el desarrollo de biopelículas bacterianas. Se realizaron 4 grupos de ratas (grupos I a IV) de 4 ratas cada uno (n=16) que fueron sacrificadas con los siguientes tiempos de incubación: 7, 15, 30 y 45 días.

3.5.2 Estudio del desarrollo de biopelículas sobre biomateriales in vivo.

Para ello se establecieron 2 grupos de 9 y 8 ratas respectivamente (n=17). Los animales del primer grupo fueron implantados con un fragmento de titanio en el oído medio e inoculados con *Pseudomonas aeruginosa* en el mismo acto quirúrgico. En el oído medio de las ratas del segundo grupo se introdujo un fragmento de hidroxiapatita además de la solución bacteriana. Ambos grupos de ratas fueron sacrificadas a los 7 días de la inoculación.

3.6. TÉCNICA QUIRÚRGICA.

3.6.1. Anestesia.

La anestesia del animal de experimentación se realizaba mediante la administración intraperitoneal con aguja y jeringuilla de insulina, de una solución compuesta por 75 mg/kg de ketamina (Ketolar^R), 2,5 mg/kg de diazepam (Valium^R) y 0,02 mg/kg de atropina. Habitualmente esta dosis era suficiente para todo el proceso, que requería entre 20 y 30 minutos, salvo en los animales de mayor peso, que requerían un tercio o media dosis más de la establecida para su peso y que era suministrada en torno a los 15 ó 20 minutos después de la primera inyección.

3.6.2. Cauterización de la trompa de Eustaquio.

Una vez anestesiado se rasuraba el dorso del animal para colocar una placa de electrobisturí monopolar. Para incrementar la conductividad del sistema se empleaba un gel conductor (OMNI^R D.O. Weaver & Co). Posteriormente se rasuraba la zona de la incisión y los alrededores a nivel de la región cervical anterior derecha.

Para la cauterización de la trompa de Eustaquio el animal se colocaba en decúbito supino con la cabeza hacia el cirujano y en posición de anti-Trendelenburg. Se colocaba un abrebocas metálico sujeto en los incisivos del animal de experimentación con el objetivo de visualizar correctamente el paladar blando del animal (Figura 3.2).

La cauterización de la trompa de Eustaquio se realizaba con un electrocoagulador monopolar (Diatermo MB 122, GIMA) con terminal curvo y recubierto por un tubo protector de plástico en su totalidad, excepto en el extremo del instrumento. De esta forma se realiza una cauterización

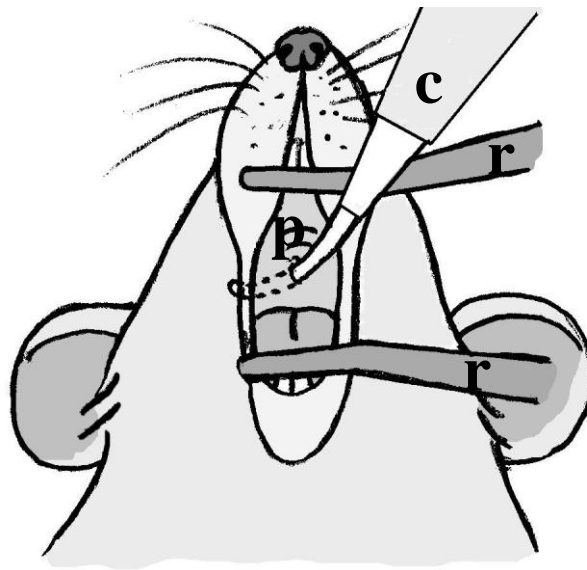


Figura 3.2 Cauterización de la Trompa de Eustaquio. Visión esquemática del procedimiento de cauterización en posición inversa a la quirúrgica para su mejor comprensión. (r) retractor. (c) electrocoagulador. (p) paladar (11).

permanente y limitada al rodete tubárico, causando así una disfunción tubárica manteniendo permeable la luz de la trompa de Eustaquio.

Para la correcta localización de la trompa de Eustaquio, se atraviesa con el electrocauterio la zona de unión del paladar duro y blando en la línea media hasta situar el terminal en la región del orificio nasofaríngeo de la trompa derecha. Se realizaban cuatro pulsos de 1 segundo de duración con una potencia de 30 vatios.

3.6.3. Preparación quirúrgica.

La posición del animal durante la cirugía era en decúbito supino con el eje mayor de la rata en posición transversal, con la cabeza del animal hacia el lado derecho del cirujano y las patas hacia la izquierda. Se colocaba sobre una



Figura 3.3 Posición quirúrgica utilizada con las extremidades superiores sujetas de forma no cruenta sobre una base de corcho, placa de electrobisturí en el dorso de la rata y con el abrebocas metálico usado para la cauterización de la trompa de Eustaquio (11).

base de corcho y con las cuatro extremidades sujetas de forma no cruenta (Figura 3.3).

El procedimiento se realizaba en condiciones estériles, para lo cual se aplicaba una solución de clorhexidina sobre la zona de la incisión y se cubría al animal con un paño verde estéril fenestrado.

El material quirúrgico estéril necesario consistía en dos pinzas de Adson, un punzón de oído, bisturí, gasas y material de sutura. Para la correcta visualización de las estructuras se empleaba un microscopio quirúrgico (Zeiss) y para la inoculación de la solución bacteriana una micropipeta de Hamilton de 25 microlitros estéril.

3.6.4. Abordaje quirúrgico del oído medio.

El abordaje a la cavidad del oído medio derecho del animal se realizaba a través de una incisión cervical derecha paralela a la rama mandibular a nivel del área submaxilar. Se identificaba el ángulo mandibular, cubierto por el músculo masetero, y la glándula submaxilar, que era rechazada en dirección caudal. Tras disecar planos musculares y fasciales, se llegaba a tocar la pared ósea timpánica profunda al músculo digástrico. Los haces musculares del digástrico se separaban en dos mediante disección roma hasta exponer la pared ósea de la bulla timpánica. El hipotímpano de las ratas sanas presenta una resistencia relativamente pequeña que es fácilmente fracturable utilizando un bisturí de hoz o un punzón hasta lograr un pequeño agujero. El agujero se ampliaba utilizando pinzas de Adson. De esta forma, se obtenía una visión directa del interior de la caja timpánica visualizándose las estructuras de la misma.

3.6.5. Inoculación, implantación y cierre.

En los casos en los que se implantaba biomaterial, un fragmento de éste se introducía en el hipotímpano del animal en primer lugar y, posteriormente, se inoculaba la solución bacteriana.

Una vez expuesto el hipotímpano del animal, se procedía a la inoculación de la solución bacteriana. Para ello se utilizaba un volumen variable de unos 50 microlitros que en la mayoría de los casos provocaba el llenado completo de la cavidad timpánica.

Tras la inoculación bacteriana y, en su caso, la implantación de biomaterial, se retiraba cualquier elemento retractor colocando el músculo digástrico en su posición original sobre el orificio creado en la cavidad timpánica, así como el resto de tejidos superficiales. La piel se suturaba con seda 3/0 y se aplicaba nuevamente clorhexidina sobre la herida. No se utilizaban antibióticos sistémicos ni tópicos debido al bajo índice de infecciones relacionado con este tipo de abordajes.

El procedimiento habitualmente duraba una media de 25-30 minutos. Una vez concluido el mismo, se colocaba cada rata en una jaula individual, separadas unas de otras y nutridas adecuadamente hasta el momento del sacrificio.

3.7. ESTUDIO PRESACRIFICIO.

Se realizaba un estudio, coincidiendo con la fecha de sacrificio, que consistía en una exploración vestibular en busca de alteraciones conductuales. Posteriormente, bajo anestesia general (siguiendo la misma pauta previamente descrita para la inoculación bacteriana), se realizaba una palpación cervical sistemática para la detección de adenopatías cervicales y una exploración otomicroscópica para detectar las potenciales alteraciones causadas por la infección bacteriana: abombamiento de la membrana timpánica, otitis media con derrame o retracción timpánica.

3.7.1. Exploración vestibular.

Para la detección de las alteraciones conductuales que la incubación bacteriana hubiera podido provocar, se realizaba una exploración del animal de experimentación utilizando una versión modificada del método descrito por Llorens y Rodríguez-Farré (110),(111). Se determinaba la presencia de alteraciones en una serie de reflejos y comportamientos espontáneos:

1. Deambulación: Durante la deambulación en una superficie horizontal, las ratas afectadas caminan en círculos, a veces se detienen y caminan hacia atrás, y aparece una oscilación de la cabeza.

2. Animal sostenido por el rabo: Las ratas normales se arquean dorsalmente y extienden las extremidades, mientras que la respuesta anormal consiste en la flexión ventral del animal o una rotación de todo el cuerpo.

3. Inhibición del reflejo de enderezamiento por contacto: las ratas son situadas en decúbito supino sobre una superficie horizontal y se coloca otra superficie horizontal en contacto con la suela de las patas. Las ratas normales

son capaces de enderezarse. En la respuesta anormal el animal no es capaz de colocarse en bipedestación y mueve las patas como si caminara por la superficie.

4. Reflejo de enderezamiento en el aire: se sostiene el animal en decúbito supino a unos 30-40 cm de altura sobre una superficie acolchada y se le deja caer. Las ratas normales recuperan la posición normal en el aire. Las ratas con déficits vestibulares no son capaces de aterrizar sobre sus cuatro patas.

A cada animal se le otorgaba una puntuación entre 0 (respuesta normal), 1 (respuesta moderadamente anómala) y 2 (respuestas patológicas) para cada exploración. La puntuación máxima posible era de 8.

3.7.2. Otomicroscopia

La visión otoscópica fue clasificada en alguna de las siguientes categorías: Normal, membrana timpánica inflamada, otitis media con derrame o retracción timpánica.

3.8. SACRIFICIO.

El sacrificio de los animales se realizaba mediante decapitación tras la administración de la solución anestésica intraperitoneal descrita previamente para el procedimiento quirúrgico. Posteriormente, se realizaba la disección del hueso temporal derecho y el aislamiento de la cavidad timpánica para localizar el orificio abierto durante la inoculación bacteriana. En la mayoría de los animales era necesario eliminar tejido fibroso e inflamatorio alrededor de dicho orificio. Una vez liberado se realizaba la toma de muestras.

3.9. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.

3.9.1. Muestras microbiológicas.

En los animales en los que se observaba que la caja timpánica estaba ocupada por material líquido se realizaba una extracción del mismo utilizando una jeringuilla de 1 ml y una aguja de insulina, ambas estériles. En los casos en los que no existía líquido libre, se llenaba la cavidad timpánica con 2-3 mililitros de suero salino fisiológico que a continuación se extraía también con jeringuilla y aguja. Las muestras obtenidas eran inoculadas en un caldo de enriquecimiento de tioglicolato (Thioglycollate broth, Biomedics®) que se mantenía durante 12-24 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se inoculaba en un medio de cultivo para microorganismos aerobios (BACTEC™ 25 ml PLUS+/AEROBIC/F*) y otro para anaerobios (BACTEC™ 25 ml PLUS+/ANAEROBIC/F*), (Becton Dickinson®), manteniéndose en la estufa durante dos días para su crecimiento.

En aquellos cultivos donde se observó crecimiento de colonias bacterianas, se procedió a su identificación.

3.9.2. Determinación de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las colonias bacterianas aisladas fueron identificadas mediante métodos fenotípicos convencionales. Para confirmar que la bacteria inoculada y la aislada tras el sacrificio eran la misma cepa, se realizó un estudio mediante electroforesis de campo pulsado. Esta técnica fue realizada en el Centro Nacional de Microbiología-Instituto de salud Carlos III de Majadahonda (Madrid)

3.9.3. Microscopia de barrido ambiental (MEBA).

3.9.3.1. Toma de muestras para MEBA.

Tras la toma de muestras microbiológicas, se obtenían uno o dos fragmentos de aproximadamente 3x3 mm procedentes de la pared ósea timpánica para estudio con MEBA. Las muestras se obtenían de zonas que presentaban la mucosa del oído hipertrofiada y procurando que la manipulación de las mismas fuera la menor posible para evitar la introducción de artefactos. En el caso de los animales a los que se habían implantado biomateriales, las muestras para estudio microscópico fueron obtenidas tomando en bloque el fragmento óseo sobre el que se apoyaba el material implantado.

3.9.3.2. Procesamiento de las muestras obtenidas para MEBA.

Las muestras se conservaban en suero salino para su estudio microscópico. Dicho estudio se realizaba el mismo día del sacrificio, a las pocas horas del mismo.

3.9.3.3. Estudio de las muestras obtenidas para MEBA.

El estudio mediante MEBA se realizaba utilizando el microscopio de barrido ambiental modelo Philips XL-30 con filamento de tungsteno y equipado con un dispositivo de enfriado Peltier. Dicho microscopio se encuentra situado en el Centro de Química Orgánica “Manuel Lora-Tamayo” de Madrid, perteneciente al Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). La muestra se colocaba dentro de la cámara del microscopio ambiental y se fijaba la temperatura a 2 °C. Lentamente se variaba la presión dentro de la cámara (de 4 hasta 2 Torr) con el objeto de controlar el proceso de deshidratación (a menor presión, mayor evaporación del agua de la muestra). Se tomaban fotografías de las áreas representativas de la muestra con los siguientes aumentos: 250x, 500x, 1000x y 2000x.

Las muestras eran observadas por dos investigadores. De acuerdo con publicaciones previas (82,85), la colonización por biopelículas se definía por la presencia en la muestra de agregados de sustancia amorfa organizada de una forma característica e interrumpiendo la superficie lisa ósea o mucosa. Se clasificaban las muestras en cuatro grados en función de la colonización de la superficie estudiada: 1) mínima o inexistente afectación (+), 2) cúmulos aislados de biopelículas (++), 3) Biopelículas que se extienden a lo largo de más del 50% de la muestra estudiada (+++) y 4) Colonización completa o casi total de la superficie ósea (++++).

Las fotografías de MEBA que se muestran en esta publicación han sido procesadas con el programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San José, California, Estados Unidos) con el fin de mejorar su contraste.

3.9.4. Microscopio confocal láser de barrido. (MCLB)

3.9.4.1. Obtención de muestras para MCLB.

Se tomaban uno o dos fragmentos de aproximadamente 3 mm de mucosa hipertrófica sin hueso subyacente del oído medio de la rata sacrificada, tratando de minimizar lo más posible la manipulación de las muestras. El tejido era estudiado en fresco a las pocas horas del sacrificio del animal de experimentación. De igual forma se extraían las muestras de titanio o hidroxiapatita en el caso de los animales implantados con dichos biomateriales.

3.9.4.2. Procesamiento de las muestras obtenidas para MCLB.

Las muestras eran teñidas con la solución Film Tracer™ LIVE/DEAD^R Biofilm Viability Kit (Invitrogen Molecular Probes^R). Esta solución está formada por una mezcla de dos colorantes, SYTO 9 y yoduro de propidio. Estos dos compuestos difieren en sus características espectrales y en su capacidad para penetrar en células bacterianas sanas. Entre las bacterias que pueden teñirse con esta solución, figuran diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* como la utilizada en el presente trabajo. Un amplio grupo de bacterias pueden ser visualizadas con este equipo. Algunos de estos patógenos pueden ser responsables de patología otológica como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y bacilos Gram negativos como *Escherichia Coli*.

Cuando se utiliza SYTO 9 exclusivamente, todas las bacterias de la población se tiñen de color verde. Por el contrario, el yoduro de propidio penetra únicamente en las bacterias con membranas dañadas produciendo fluorescencia de color rojo y una disminución en la intensidad de la

fluorescencia verde generada por la tinción con SYTO 9. El nivel de excitación/emisión máxima es de 480/500 nm para SYTO 9 y de 490/635 nm para el yoduro de propidio. El fondo permanece oscuro, no fluorescente.

El procedimiento que se seguía para la correcta tinción de las muestras era el siguiente: inicialmente se preparaba una solución fluorescente añadiendo 3 µl de SYTO 9 y 3 µl de yoduro de propidio a 1 ml de agua estéril. Se colocaba la muestra a teñir en un tubo Eppendorff. Se añadían 100 µl de la solución fluorescente. Se incubaba durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posteriormente, se realizaban tres lavados con solución tampón PBS de cinco minutos cada uno. Se lavaba el exceso de colorante con agua estéril y se colocaba la muestra en un portaobjetos.

3.9.4.3. Estudio de las muestras obtenidas para MCLB.

Para la visualización de las muestras se utilizó el microscopio confocal Leica TCS SPE-DM 5500 Q V-Vis equipado con tres fuentes de láser operando a 488nm, 532 nm y 635nm, perteneciente al Museo de Ciencias Naturales de Madrid. Las tres últimas ratas fueron estudiadas mediante el microscopio confocal Leica SP5 de tres canales láser, operando a 488, 543 y 633 nm, perteneciente al Hospital Puerta de Hierro de Majadahonda.

Al igual que las muestras estudiadas mediante MEBA, las muestras que se visualizaban con MCLB eran observadas por dos investigadores independientes y puntuadas de + a ++++ en función del grado de colonización.

IV RESULTADOS.

4. RESULTADOS.

4.1. RESULTADOS CLÍNICOS.

4.1.1. Otomicroscopia.

Los hallazgos otomicroscópicos de los distintos animales estudiados se clasificaron en cuatro categorías: normal, membrana inflamada, derrame y retracción timpánica.

Se designó como membrana timpánica inflamada a aquellos oídos que presentaron una otoscopia compatible con la existencia de una otitis media aguda, representada por una membrana enrojecida y en ocasiones abombada. En el caso de la rata número 2 se observó un conducto auditivo externo lleno de secreciones purulentas que impidió observar la membrana timpánica con detalle; estos hallazgos son indicativos de la presencia de una otitis media aguda en fase supurativa. Los oídos clasificados como “derrame” correspondieron a animales que mostraban una membrana timpánica íntegra sin signos de inflamación ni perforación pero con coloración mate u opaca, o con signos de presentar líquido en el oído medio. Con el término “retracción timpánica” se designaron a aquellos oídos con membrana timpánica íntegra y deprimida. Tan sólo la rata número 11 mostró una otomicroscopia normal.

4.1.1.1. Otomicroscopia en oído medio inoculado sin implantación de biomateriales.

Los hallazgos otomicroscópicos de las ratas pertenecientes a los grupos I y II, que fueron inoculadas y no implantadas con titanio ni hidroxiapatita, mostraron una tendencia al predominio de los fenómenos inflamatorios agudos. De esta forma se pudo observar un predominio de membranas timpánicas

inflamadas y abombadas o fenómenos como otorrea en el conducto auditivo externo. Por el contrario las ratas de los grupos III y IV, con tiempos de incubación superiores, mostraron signos otoscópicos de cronicidad con mayor frecuencia: retracción timpánica y derrame (Tabla 4.1).

RATA	GRUPO I (7 Días)	RATA	GRUPO II (15 Días)
Rata 1	Membrana inflamada	Rata 5	Membrana inflamada
Rata 2	Otorrea	Rata 6	Retraído
Rata 3	Membrana inflamada	Rata 7	Membrana inflamada
Rata 4	Membrana inflamada	Rata 8	Derrame
RATA	GRUPO III (30 Días)	RATA	GRUPO IV (45 Días)
Rata 9	Retraído	Rata 13	Retraído
Rata 10	Derrame	Rata 14	Derrame
Rata 11	Normal	Rata 15	Membrana inflamada
Rata 12	Membrana inflamada	Rata 16	Retraído

TABLA 4.1 Otoscopia de las ratas de los grupos I a IV. Otoscopia en los distintos grupos inoculados con la solución bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* previa al sacrificio del animal de experimentación.

4.1.1.2. Otomicroscopia en oído medio inoculado e implantado con biomateriales.

Las ratas inoculadas e implantadas con biomateriales presentaron resultados otomicroscópicos análogos a los de las ratas no implantadas, mostrando un predominio de los fenómenos inflamatorios y de la presencia de

derrame timpánico. Tampoco existían diferencias significativas entre las ratas implantadas con titanio respecto a las implantadas con hidroxiapatita (Tabla 4.2).

RATA	MEMBRANA TIMPÁNICA	RATA	MEMBRANA TIMPÁNICA
Ti-1	Derrame	HA-1	Derrame
Ti-2	Derrame	HA-2	Derrame
Ti-3	Retraído	HA-3	Membrana inflamada
Ti-4	Membrana inflamada	HA-4	Membrana inflamada
Ti-5	Membrana inflamada	HA-5	Membrana inflamada
Ti-6	Derrame	HA-6	Derrame
Ti-7	Membrana inflamada	HA-7	Perforado
Ti-8	Derrame	HA-8	Derrame
Ti-9	Membrana inflamada		

TABLA 4.2 Otoscopia de las ratas implantadas con biomateriales. Otoscopia previa al sacrificio (7 días) en los animales inoculados e implantados con biomateriales.

4.1.2. Alteraciones vestibulares.

Tan sólo dos de los animales estudiados no presentaron alteraciones conductuales en relación con la afectación del laberinto derecho en el momento del sacrificio. Sin embargo las alteraciones vestibulares observadas fueron de carácter leve en la mayoría de ellos, especialmente en los animales que más tiempo incubaron la solución de *Pseudomonas aeruginosa*. En la siguiente

tabla se detallan las puntuaciones obtenidas en el momento del sacrificio en cada grupo de estudio.

RATA	PUNTUACIÓN	RATA	PUNTUACIÓN
Rata 1	4	Ti-1	3
Rata 2	4	Ti-2	3
Rata 3	3	Ti-3	2
Rata 4	3	Ti-4	4
Rata 5	5	Ti-5	5
Rata 6	2	Ti-6	3
Rata 7	3	Ti-7	6
Rata 8	3	Ti-8	3
Rata 9	2	Ti-9	2
Rata 10	4	HA-1	4
Rata 11	3	HA-2	4
Rata 12	5	HA-3	3
Rata 13	0	HA-4	3
Rata 14	4	HA-5	4
Rata 15	5	HA-6	4
Rata 16	0	HA-7	4
		HA-8	4

TABLA 4.3 Exploración vestibular previa al sacrificio. Puntuación obtenida por cada uno de los animales de experimentación tras la exploración vestibular realizada previa al sacrificio.

4.2. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS.

Las muestras obtenidas en el momento del sacrificio demostraron la existencia de *Pseudomonas aeruginosa* en todas las ratas inoculadas excepto en las ratas 3 y 7 en las que el cultivo mostró crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

El estudio mediante electroforesis de campo pulsado realizado en el Centro Nacional de Microbiología-Instituto de salud Carlos III de Majadahonda (Madrid) mostraba que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* obtenida tras el sacrificio coincidía en todos los casos con la cepa inoculada (serotipo O : 6, O : 15), descartando por lo tanto la presencia de mutaciones en la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* inoculada.

4.3. RESULTADOS MICROSCÓPICOS.

4.3.1. Resultados con microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA).

La visualización mediante MEBA de muestras de hueso procedente de hipotímpano mostró la existencia de biopelículas distribuidas de forma variable. Como se especifica en el apartado de material y métodos (3.9.3.), se consideró la presencia de biopelículas al detectar material amorfo organizado en forma de agregados interrumpiendo la superficie relativamente lisa del hueso o mucosa (Figura 4.1). Las muestras fueron clasificadas de + a ++++ en función del grado de colonización observado por dos investigadores.

La superficie ósea de la caja timpánica de la rata, visible mediante microscopía de barrido, es una estructura relativamente lisa y fácilmente distinguible de la mucosa ótica colonizada (Figura 4.1). En pocas ocasiones

pueden plantearse problemas en la distinción entre hueso colonizado por biopelículas bacterianas y las rugosidades normales del hueso de la caja timpánica, especialmente en los casos en los que hay una colonización de bacterias incipiente o poco desarrollada.

La figura 4.1A corresponde a una microfotografía tomada de la rata 15 con alto grado de deshidratación (3,4 Torr). Se puede observar una zona rugosa de hueso pero sin colonización bacteriana. Cuando la muestra está hidratada puede resultar difícil diferenciar las rugosidades óseas normales de la existencia de colonias bacterianas embebidas en agua y glucocálix. Mediante el MEBA podemos deshidratar la muestra y comprobar que las irregularidades óseas persisten sin cambios, descartando por tanto la existencia de biopelículas bacterianas.

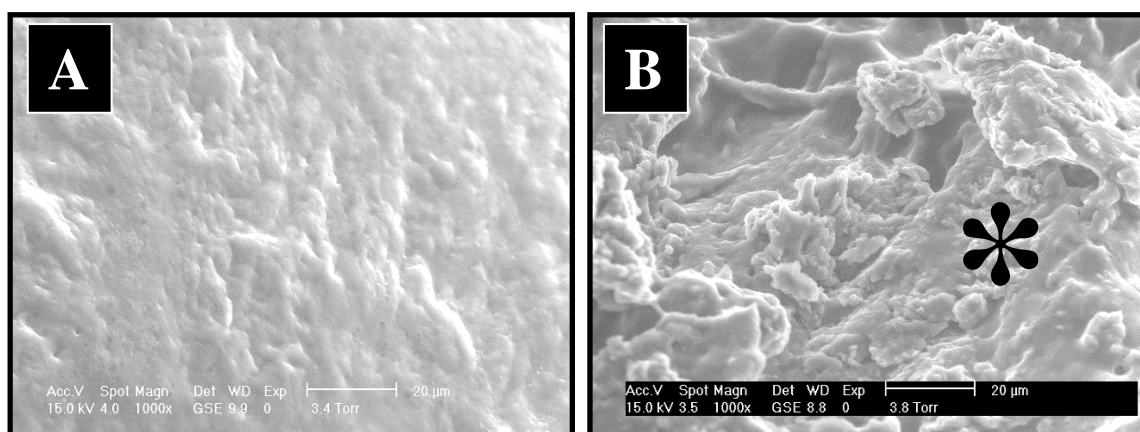


Figura 4.1. Diferenciación hueso-biopelícula mediante MEBA. 4.1.A. Microfotografía de muestra de la mucosa del oído de la rata 15 mediante MEBA tomada a 3,4Torr y 1000x aumentos en la que puede observarse la superficie ligeramente rugosa del hueso del oído medio de la rata. **4.1.B.** Tomada de la rata 10, se observa material en forma de agregado que interrumpe la superficie ósea relativamente lisa y que se define como biopelícula bacteriana (*).

4.3.1.1. MEBA en oído medio inoculado sin implantación de biomaterial.

El estudio del oído medio de las ratas inoculadas con la solución de *Pseudomonas aeruginosa* demostró una colonización variable bacteriana en forma de biopelículas (Tabla 4.4). La detección de biopelículas utilizando MEBA fue irregular, siendo más abundante en las ratas sacrificadas con poco tiempo de incubación (7 y 15 días de incubación) y con tendencia a la desaparición posteriormente (30 y sobre todo 45 días).

Todas las muestras analizadas mostraron imágenes compatibles con cúmulos bacterianos en forma de biopelículas, aunque el número y grado de desarrollo de las mismas fue variable.

Las figuras 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5 ilustran la colonización hallada en los animales inoculados y no implantados con biomaterial. Se muestra una fotografía de cada rata de cada uno de los grupos. La figura 4.2 corresponde al primer grupo de animales sacrificados a los 7 días, la figura 4.3 a las ratas analizadas a los 15 días de la inoculación, la figura 4.4 muestra la colonización de las ratas a los 30 días y, por último, la figura 4.5 corresponde a la afectación bacteriana a los 45 días.

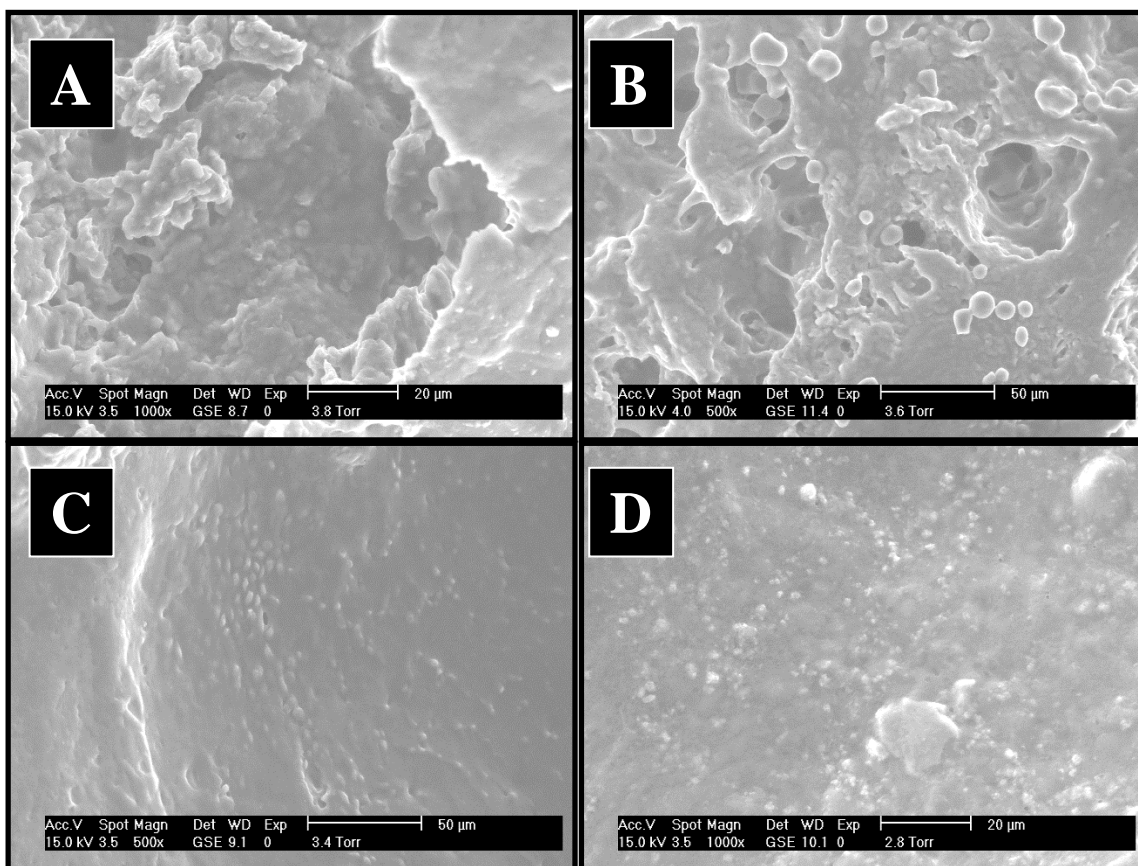


Figura 4.2 A, B, C, D. Colonización de la mucosa ótica de las ratas 1 a 4 (MEBA).

Fotografías tomadas mediante MEBA a la mucosa ótica de las ratas 1 a 4

Las ratas correspondientes al grupo I presentaron una importante colonización, especialmente las ratas 1 y 2 (Figuras 4.2A, 4.2B). En todas las muestras estudiadas, pertenecientes al primer grupo de estudio, se visualizaron biopelículas bacterianas que se extendían ocupando la mayor parte del tejido visualizado. Las ratas 3 y 4 (Figuras 4.2C, 4.2D) presentaban una menor cantidad de biopelículas sobre los fragmento óseos estudiados. Además, la organización de los agregados bacterianos fue más sencilla, sin visualizarse las típicas estructuras en forma de torre, que sí pudieron detectarse en las ratas 1 y 2.

La figura 4.3 corresponde a las ratas del grupo II (ratas 5 a 8 respectivamente), sacrificadas todas ellas a los 15 días de la inoculación. En este grupo de estudio se observó una importante colonización bacteriana, algo menos exuberante que la del primer grupo. Al igual que en el grupo anterior, pudieron verse biopelículas bacterianas con un alto grado de desarrollo y ocupando la mayor parte del hueso estudiado (Figura 4.3A). Sin embargo las ratas 7 y 8, que corresponden a las figuras 4.3C y 4.3D respectivamente, mostraron una escasa colonización en la mayor parte del hueso. La figura 4.3C es una imagen tomada, con gran aumento de una zona estudiada que presentaba un foco de colonización aislado, ya que la mayor parte del hueso no

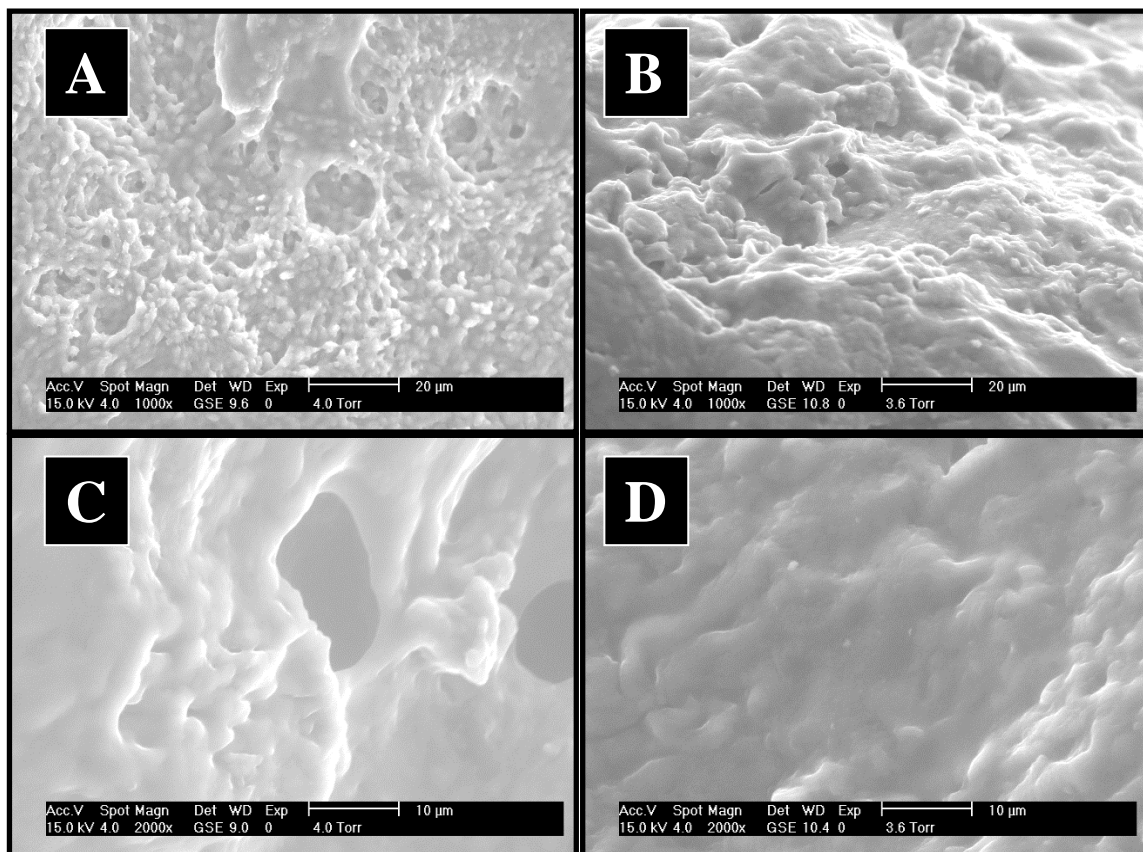


Figura 4.3 A, B, C, D. Colonización de la mucosa ótica de las ratas 5 a 8 (MEBA). Fotografías tomadas mediante MEBA de la mucosa del oído de las ratas 5 a 8 respectivamente, sacrificadas todas ellas a los 15 días de la inoculación.

estaba cubierto por biopelículas. Proporciona, sin embargo, una imagen detallada de la estructura de la colonia bacteriana. La rata 6 (Figura 4.3B) presentaba una colonización difusa abundante, sin llegar a observarse biopelículas en forma de torre, como las visualizadas en la rata 5.

En la figura 4.4 se muestran los resultados obtenidos tras el estudio con MEBA del tercer grupo, formado por ratas sacrificadas a los 30 días de la inoculación. Las cuatro ratas del grupo mostraron colonización en forma de biopelícula. La distribución bacteriana fue más abundante llegando a superar el 50% de la muestra, con una estructura más madura y desarrollada en el caso

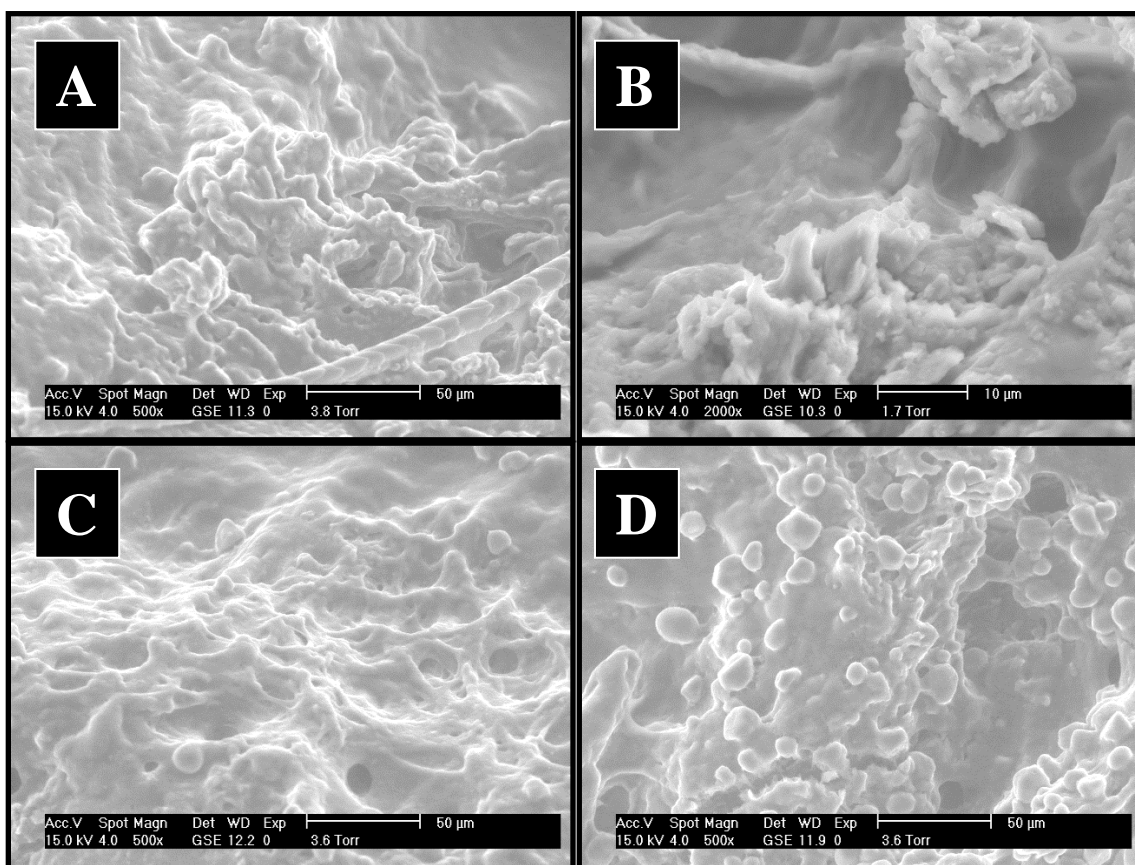


Figura 4.4 A, B, C, D. Colonización de la mucosa ótica de las ratas 9 a 12 (MEBA). Fotografías tomadas mediante MEBA de la mucosa del oído de las ratas 9 a 12 respectivamente, sacrificadas todas ellas a los 30 días de la

de la rata 10 (Figura 4.4B). Las ratas 9, 11 y 12, correspondientes a las figuras 4.4A, 4.4C y 4.4D, mostraron agregados bacterianos aislados con escaso desarrollo.

Colonización mucosa ótica ratas 9 a 12 (MEBA). Las ratas sacrificadas a los 45 días de la inoculación mostraban una menor expresión en la formación de biopelículas respecto a los grupos con tiempos de incubación de 7 y 15 días. Como puede observarse en la figura 4.5, en la mayoría de las muestras estudiadas se distinguen biopelículas con escaso desarrollo y que se extienden

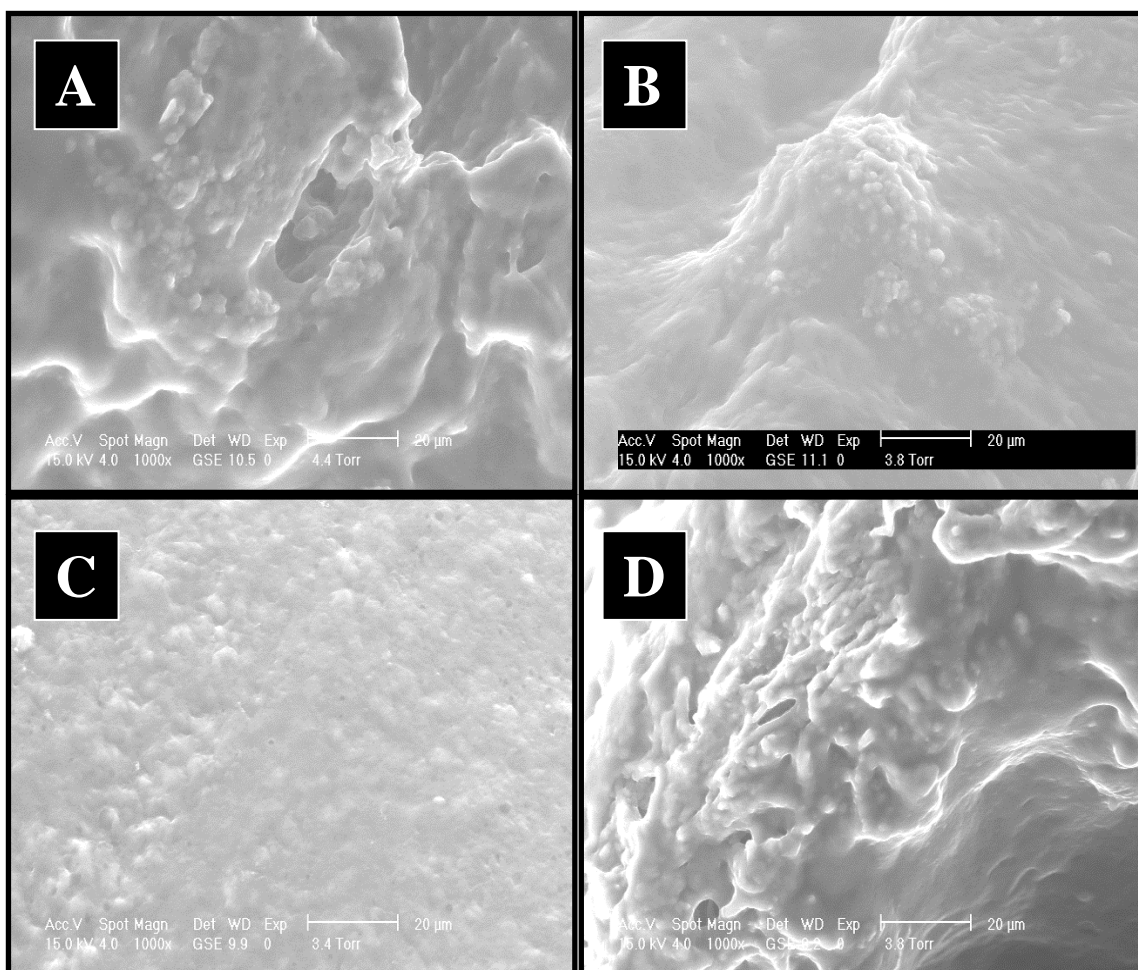


Figura 4.5 A, B, C, D. Colonización de la mucosa ótica de las ratas 13 a 16 (MEBA). Fotografías tomadas mediante MEBA de la mucosa del oído de las ratas 13 a 16 respectivamente. sacrificadas todas ellas a los 45 días de la inoculación.

de forma puntual por zonas concretas de la mucosa. Las imágenes 4.5A y 4.5D correspondientes a las ratas 13 y 16 mostraron mayor colonización, sin superar el 50% de la extensión de la muestra. En el caso de las ratas 14 y 15, la formación de biopelículas era escasa y aislada, especialmente en las zonas de hueso liso, presentándose mayor colonización en pliegues, resaltes o hendiduras óseas.

En la tabla 4.4, se resumen numéricamente las puntuaciones otorgadas a cada uno de los grupos en función del grado de extensión y desarrollo de las biopelículas sobre la superficie del oído medio estudiado.

RATA	T. INCUBACIÓN	PUNTUACIÓN	RATA	T. INCUBACIÓN	PUNTUACIÓN
1	7 DÍAS	++++	9	30 DÍAS	++
2	7 DÍAS	++++	10	30 DÍAS	+++
3	7 DÍAS	++	11	30 DÍAS	++
4	7 DÍAS	++	12	30 DÍAS	++
5	15 DÍAS	++++	13	45 DÍAS	++
6	15 DÍAS	+++	14	45 DÍAS	+
7	15 DÍAS	++	15	45 DÍAS	+
8	15 DÍAS	+	16	45 DÍAS	++

TABLA 4.4 Desarrollo de biopelículas en los grupos I a IV. A cada animal se aplicó el siguiente criterio para determinar el grado de desarrollo de biopelículas: + mínima o inexistente afectación, ++ cúmulos aislados de biopelículas, +++ biopelículas que se extienden a lo largo de más del 50% de la muestra estudiada y ++++ colonización completa, o casi total, de la superficie ósea.

El MEBA permite visualizar cualquier tipo de depósito superficial a la mucosa. En general, la distinción entre una colonia bacteriana y la superficie ósea no colonizada es sencilla. Sin embargo, en determinados casos puede resultar difícil diferenciar entre la superficie ligeramente rugosa del hueso timpánico y la colonización bacteriana. En tan sólo unos minutos, variando la presión en el interior de la cámara donde se coloca la muestra, se produce una deshidratación controlada del material a estudiar. Este procedimiento afecta

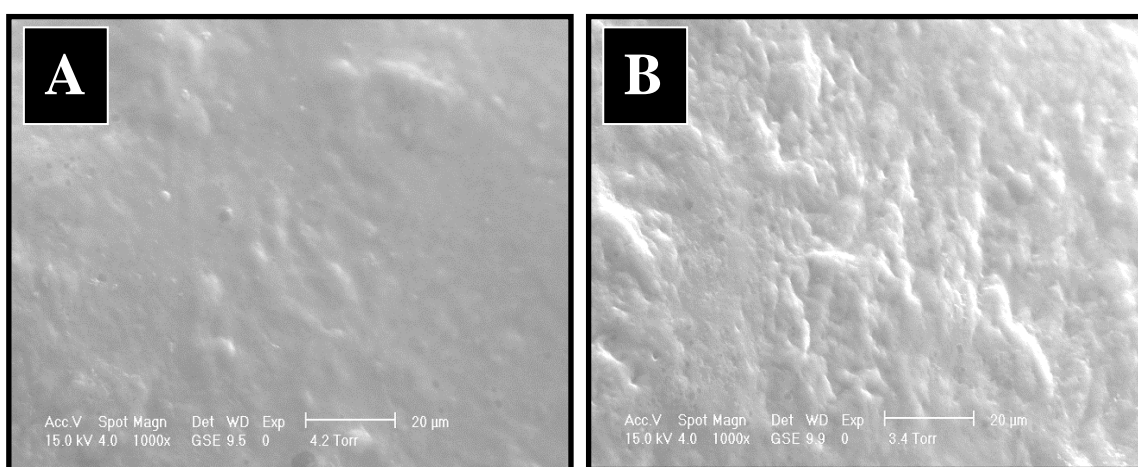


Figura 4.6 Deshidratación de muestras mediante MEBA. Fotografías tomadas mediante MEBA a la superficie ósea de la rata 15. Ambas fotografías están tomadas con los mismos aumentos (1000x). En la figura **4.6A**, la mucosa presenta un considerable grado de hidratación al estar tomada con una presión de 4,2Torr. En algunas zonas de la fotografía se aprecia una fina capa de material sobre la superficie ondulada ósea que impide visualizar el hueso de forma nítida. En la **figura B** (3,4Torr) se muestra el aspecto de la superficie ósea con mayor grado de deshidratación, observándose las irregularidades de la misma.

esencialmente a la matriz extracelular bacteriana, por su rico contenido acuoso. Cuando la imagen ondulada que observamos con el MEBA persiste, a pesar de la deshidratación, concluimos que no existe colonización. Cuando el depósito que visualizamos varía, o aparecen formas redondeadas características, concluimos que existe colonización bacteriana incipiente o poco organizada (Figura 4.6).

El estudio detallado de aquellas ratas que presentaban una colonización

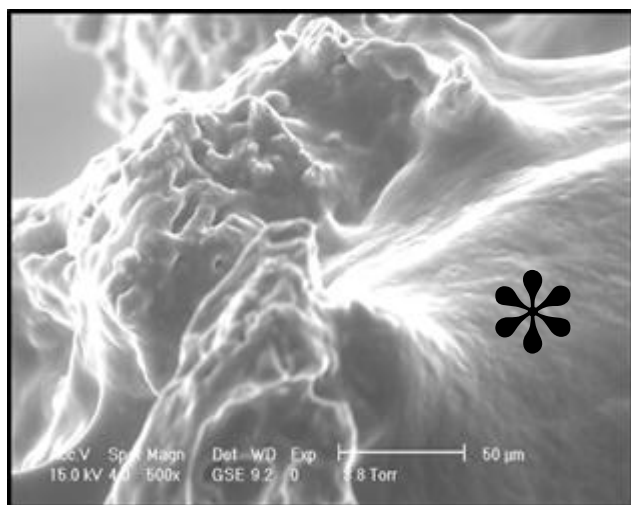


Figura 4.7 Colonización en saliente óseo (MEBA). Fotografía tomada de la rata 16 a 500x y 3.4 Torr. Se observa un saliente óseo colonizado con biopelículas con un desarrollo intermedio. Puede observarse una zona de hueso lisa sin colonización (*).

limitada o no masiva, mostró que ésta era predominante en zonas de hueso agrietado, en cavidades o en salientes óseos (Figura 4.7). Por el contrario, las superficies de hueso liso y mejor conservado presentaban cierta resistencia a la colonización por bacterias. La figura 4.7 muestra un saliente del hueso

de la caja timpánica cubierto por material compatible con la presencia de bacterias en forma de biopelícula. Existe una clara delimitación entre la zona colonizada y la superficie ósea lisa libre de bacterias. La imagen fue tomada de la rata 16 con un cierto grado de deshidratación de la muestra (3,4 Torr de presión y con 500x).

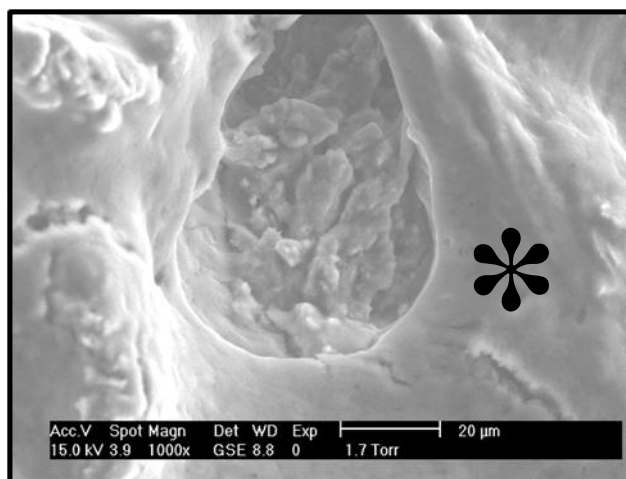


Figura 4.8 Colonización bacteriana en una cavidad timpánica (MEBA). Fotografía tomada del oído medio de la rata 3 a 1000x y 1,7 Torr. Se observa una cavidad timpánica colonizada por biopelículas con un desarrollo intermedio. Puede observarse una zona de hueso lisa sin colonización (*).

La figura 4.8, tomada de la rata 3, muestra una concavidad ósea irregular con una colonia bacteriana en su interior, siendo el resto del hueso una superficie lisa y no colonizada. Las ratas 3 (Figuras 4.8, 4.9) y 16, (Figura 4.7) presentaron una colonización bacteriana limitada en los fragmentos estudiados. No se observaron grandes torres en forma de

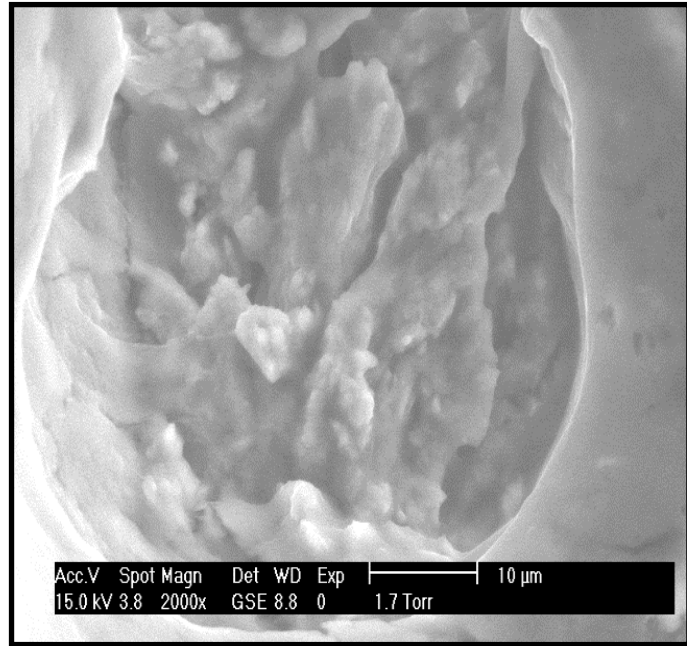


Figura 4.9 Colonización bacteriana en una cavidad timpánica ampliada (MEBA). Fotografía ampliada (2000x) de la figura 4.8 en la que se observa de forma detallada un agregado bacteriano en forma de biopelícula.

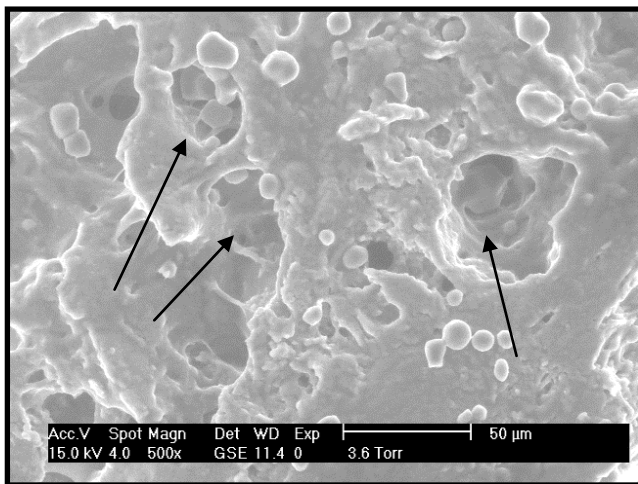


Figura 4.10 Matriz extracelular (MEBA) Fotografía en la que pueden observarse biopelículas maduras que colonizan la mucosa del oído medio de la rata 2. Puede observarse el gran desarrollo de la matriz extracelular y los característicos canales de las biopelículas (flecha).

biopelículas maduras ni una gran extensión de la colonización. Sin embargo sí se detectaron acúmulos de biopelículas en determinadas localizaciones como grietas del hueso y otras irregularidades.

La figura 4.9 muestra una imagen detallada de la biopelícula alojada en el interior de la cavidad ósea observada en la figura 4.8.

El MEBA proporciona imágenes precisas de la estructura de la biopelícula. De esta forma, es posible visualizar la característica disposición en forma de torre que presentan las biopelículas maduras. También permite la detección de elementos característicos de las colonias bacterianas, como los canales que atraviesan la matriz extracelular y que permiten el paso de nutrientes hacia las células (Figura 4.10).

A los 7 días podemos observar biopelículas completamente desarrolladas (Figura 4.2A, 4.2B), por lo que es probable que el desarrollo de las biopelículas pueda comenzar a las 24-48 horas de la inoculación en el oído medio de la rata, como se ha demostrado en otros modelos (96). Sin embargo,

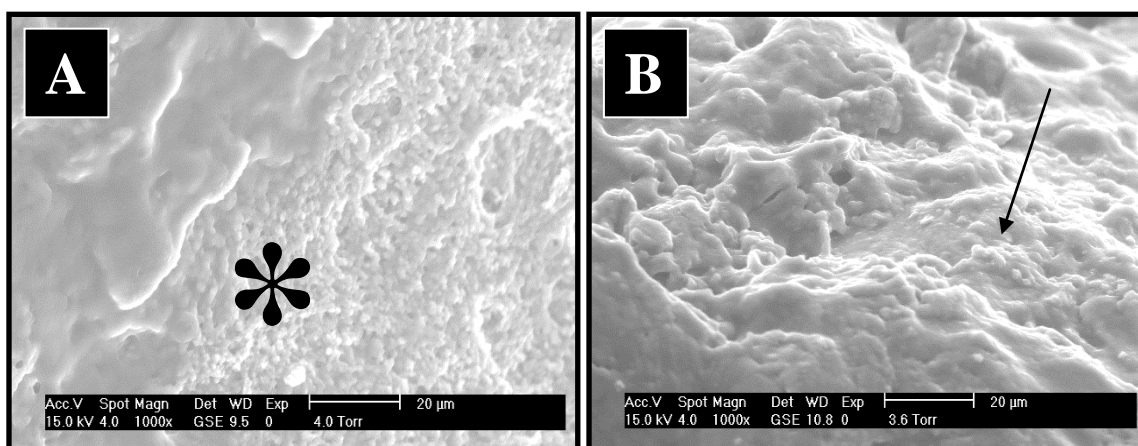


Figura 4.11 Biopelículas maduras y agregados aislados. Fotografías tomadas de distintas zonas de la mucosa del oído de la rata 5 a igual aumento (1000x) y con presión similar. Pueden verse biopelículas maduras (*) y agregados bacterianos aislados (flecha).

al aumentar el tiempo de incubación (30 y 45 días), se observa una pérdida de la cantidad y robustez de las biopelículas.

Las colonias bacterianas son capaces de progresar y formar conglomerados. La liberación de bacterias en su forma planctónica y la siembra a distancia de las mismas favorece la extensión de la colonización. De esta forma, es posible ver conglomerados bien desarrollados de biopelículas junto a

agregados bacterianos aislados que presumiblemente, y si las condiciones del medio son las adecuadas, formarán biopelículas maduras (Figura 4.11).

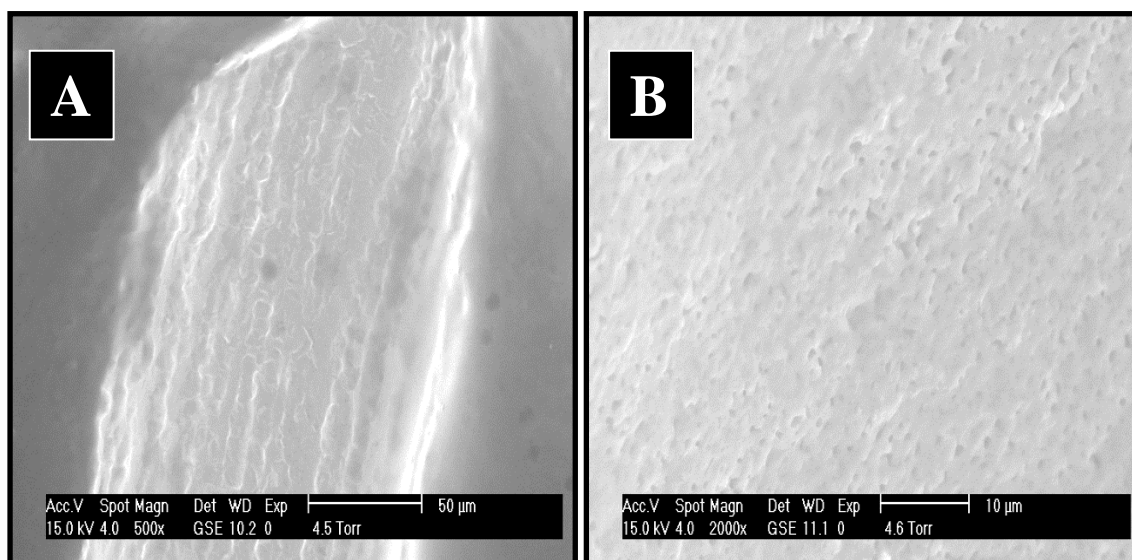


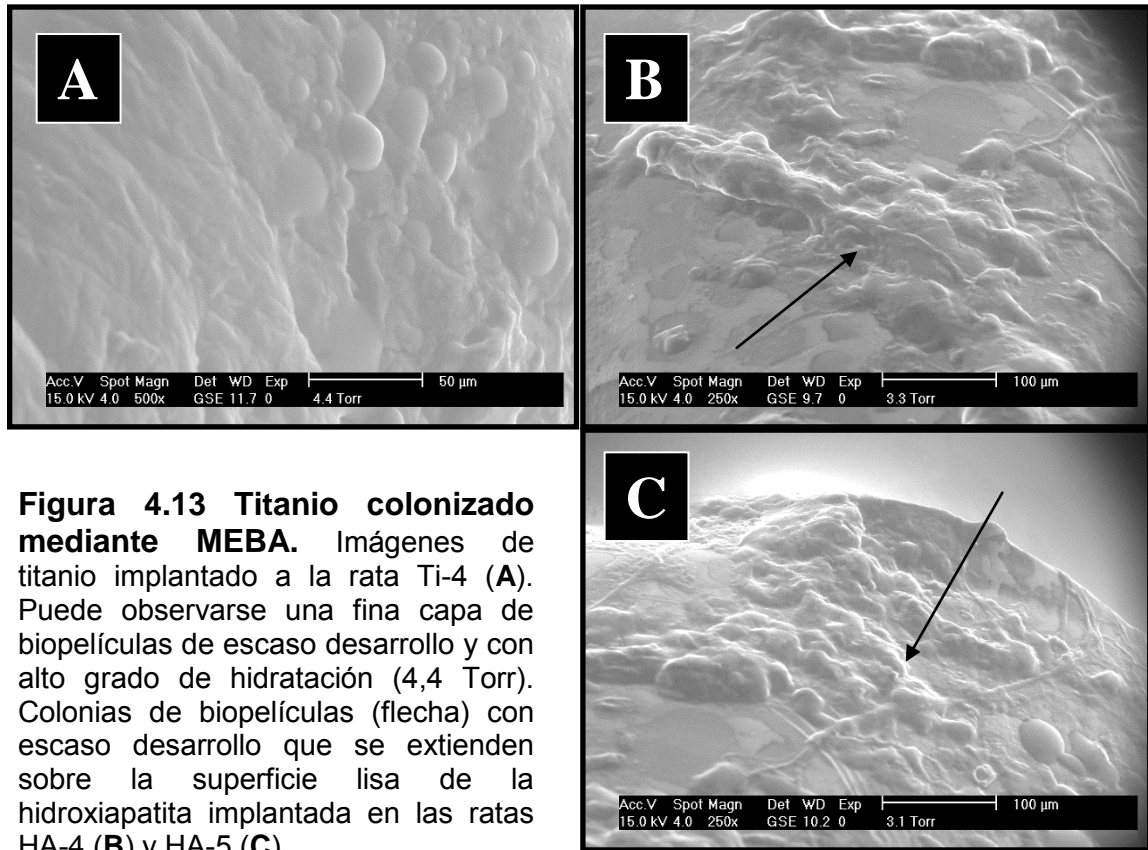
Figura 4.12 Titanio e Hidroxiapatita mediante MEBA. Imágenes de dos fragmentos de titanio (A) e hidroxiapatita (B) tomadas con MEBA, donde se observa el aspecto normal, no colonizado de ambos materiales.

4.3.1.2. MEBA en oído medio inoculado e implantado con biomateriales.

Los materiales utilizados en el estudio fueron el titanio y la hidroxiapatita. Presentan una imagen característica en el estudio mediante MEBA. El titanio ofrece un aspecto liso, con pequeñas irregularidades, mientras que la hidroxiapatita presenta un aspecto más compacto y con porosidad (figura 4.12).

El estudio mediante MEBA demostró la capacidad de ambos biomateriales para ser colonizados por biopelículas (Figura 4.13). El número y grado de desarrollo de las biopelículas fue relativamente pequeño, si se compara con el grado de colonización de prótesis compuestas de estos

biomateriales extraídas a pacientes como consecuencia de la infección de los mismos.



Como se recoge en la tabla 4.5, la colonización en los biomateriales estudiados existe, pero es escasa. Comparando la colonización por biopelículas entre el titanio y la hidroxiapatita, parece que existe mayor grado de colonización en la hidroxiapatita que en el titanio (Figura 4.13)

A pesar de que el titanio y la hidroxiapatita son materiales inertes, extraños al organismo de la rata, resultaron ser más resistentes a la

colonización por biopelículas que la mucosa ótica de la rata. De esta forma, en la mayoría de los animales se pudo observar un grado y extensión de la colonización muy superior en la mucosa, respecto a la observada sobre la superficie del biomaterial (tabla 4.5).

RATA	PUNTUACIÓN	RATA	PUNTUACIÓN
Ti-1	+++/+	HA-1	++++/+
Ti-2	+++/+	HA-2	+++/>+++
Ti-3	++/+	HA-3	++/+
Ti-4	+++/>+	HA-4	+++/>++
Ti-5	++/>+	HA-5	++/>+
Ti-6	+++/>+	HA-6	+++/>+
Ti-7	+++/>+	HA-7	+++/>+
Ti-8	++/>+	HA-8	++/>++
Ti-9	+++/>+		

Tabla 4.5 Desarrollo de biopelículas en mucosa ótica y biomaterial implantado. Puntuaciones recogidas referidas a la colonización de las muestras obtenidas tras la inoculación bacteriana con *Pseudomonas aeruginosa* e implantadas con biomaterial (Ti- Titanio, HA- Hidroxiapatita). La primera puntuación se refiere a la extensión sobre la mucosa estudiada, puntuando + a la escasa o nula colonización y ++++ al grado máximo. La segunda puntuación, igualmente entre + y ++++, se refiere a la afectación del biomaterial implantado en el oído medio de la rata.

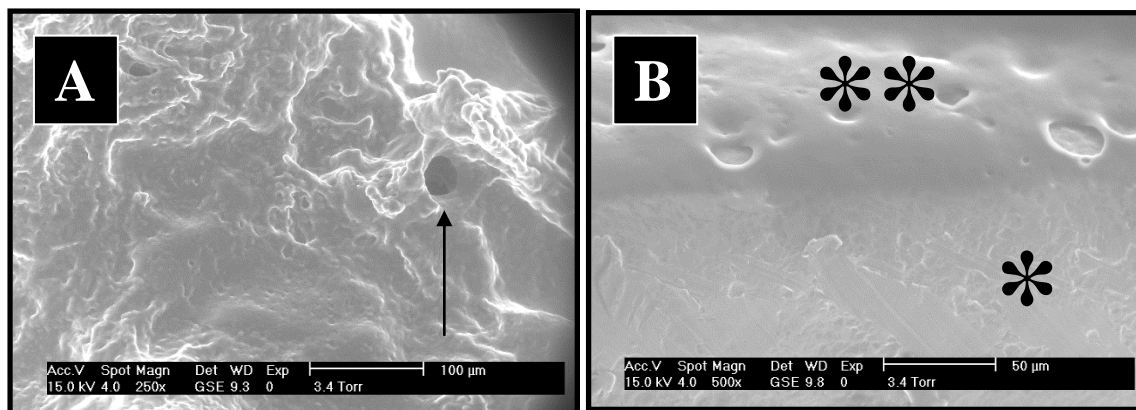


Figura 4.14 Colonización de mucosa y titanio implantado. Imágenes correspondientes a la rata Ti-9 tomadas con alto grado de deshidratación (3.4Torr). **A:** Mucosa del oído medio en el que se observa un alto grado de desarrollo de biopelículas que ocupa casi completamente la superficie ósea. En la figura se aprecia la típica estructura de la matriz extracelular con canales en su interior (flecha) **B:** Superficie de un fragmento de titanio con las erosiones habituales del material (*), cubiertas parcialmente por una fina capa lisa que podría corresponder a biopelículas poco desarrolladas (**).

En las figuras 4.14 y 4.15 se muestra el resultado de la colonización bacteriana de la mucosa ótica comparada con la de la superficie del biomaterial, en los animales implantados y sacrificados a los 7 días de la inoculación.

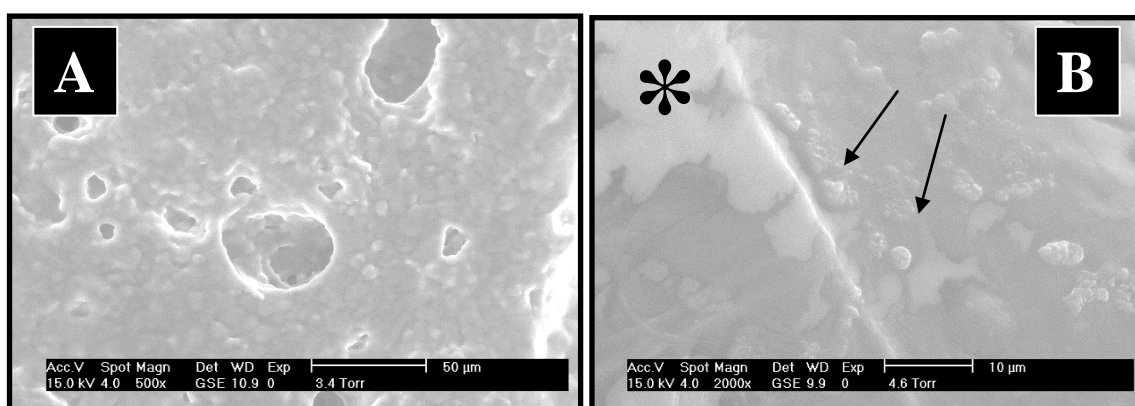


Figura 4.15 Colonización de mucosa e hidroxiapatita implantada. Imágenes correspondientes a la rata HA-2. **A:** Mucosa del oído medio en el que se observa un alto grado de desarrollo de biopelículas que impide ver la superficie ósea normal no colonizada. **B:** Superficie de un fragmento de hidroxiapatita en el que se observan agregados bacterianos de pequeño tamaño y aislados (flecha), que no cubren completamente la superficie lisa del biomaterial (*). Nótese el diferente grado de desarrollo de las biopelículas en una y otra superficie.

4.3.2. Resultados con Microscopio Confocal Láser de Barrido (MCLB).

Debido a la falta de disponibilidad inicial del MCLB, sólo pudieron estudiarse mediante el MCLB las últimas 5 ratas del estudio: HA-4 a HA-8. Se analizaron muestras procedentes de la mucosa del oído medio y el fragmento de biomaterial implantado, que fue hidroxiapatita en todos los casos. El estudio con el microscopio confocal nos permitió seccionar la biopelícula madura, es decir, realizar cortes ópticos del interior de la colonia bacteriana y no limitarnos únicamente a visualizar la superficie de la biopelícula. Además, utilizando los colorantes SYTO-9 y yoduro de propidio observamos la distribución de células bacterianas vivas y muertas, en función de la intensidad de color recogida por el MCLB. Las zonas de las imágenes que se ven en color negro corresponden a zonas no fluorescentes y que, por tanto, no estaban colonizadas por las bacterias que se marcan con los colorantes utilizados. El microscopio MCLB realizó un barrido obteniendo cortes en profundidad de la mucosa de la rata. Inicialmente se recogía la señal emitida por las células bacterianas teñidas en rojo y, posteriormente, en verde (Figura 4.16).

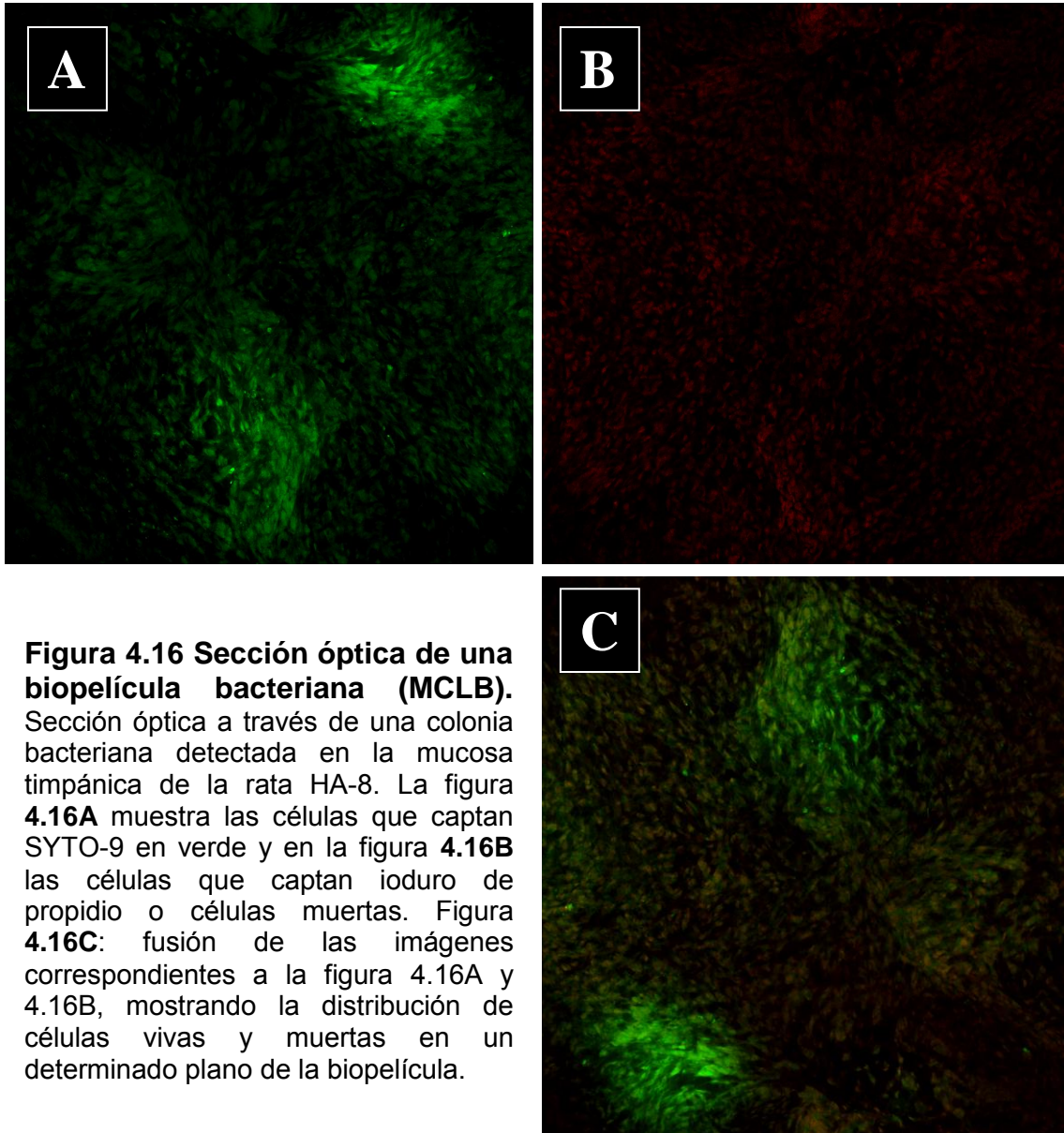


Figura 4.16 Sección óptica de una biopelícula bacteriana (MCLB).

Sección óptica a través de una colonia bacteriana detectada en la mucosa timpánica de la rata HA-8. La figura 4.16A muestra las células que captan SYTO-9 en verde y en la figura 4.16B las células que captan yoduro de propidio o células muertas. Figura 4.16C: fusión de las imágenes correspondientes a la figura 4.16A y 4.16B, mostrando la distribución de células vivas y muertas en un determinado plano de la biopelícula.

A continuación mediante un programa de ordenador se pueden fusionar ambas imágenes mostrando la colonización de bacterias vivas y muertas en un determinado plano de la biopelícula (figura 4.16C).

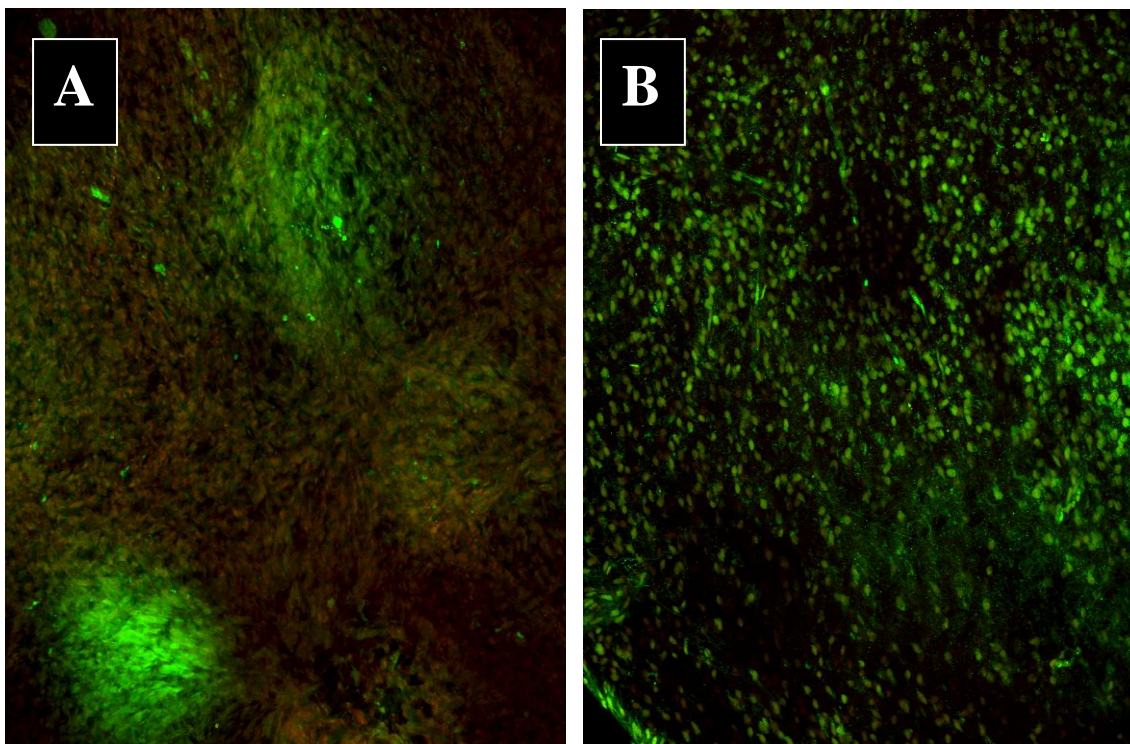


Figura 4.17 Espesor de la biopelícula mediante MCLB. Muestras de mucosa de las ratas HA-8 (A) y HA-7 (B) mediante MCLB tras la fusión de todos los planos de corte realizados a la biopelícula.

También es posible superponer un determinado número de secciones ópticas, reduciendo el espesor de la biopelícula a un solo plano (Figura 4.17). En las muestras obtenidas puede observarse una tenue tinción roja, correspondiente a células con membrana dañada, frente al predominio verde que corresponde a células indemnes bacterianas.

Los resultados obtenidos mediante el MCLB eran superponibles a los obtenidos mediante MEBA. Se observaban biopelículas bacterianas en todas las muestras estudiadas aunque, al igual que con el MEBA, el grado de colonización fue variable. Las ratas que fueron implantadas con hidroxiapatita y estudiadas con MCLB mostraban una distribución difusa de zonas fluorescentes en verde y rojo, correspondientes a células bacterianas con membrana íntegra y dañada. Las zonas de las imágenes oscuras corresponden

a zonas sin colonización bacteriana, que no captan colorante. En los fragmentos de hidroxiapatita estudiados se observaron pequeños cúmulos bacterianos sobre el fragmento protésico (Figura 4.18).

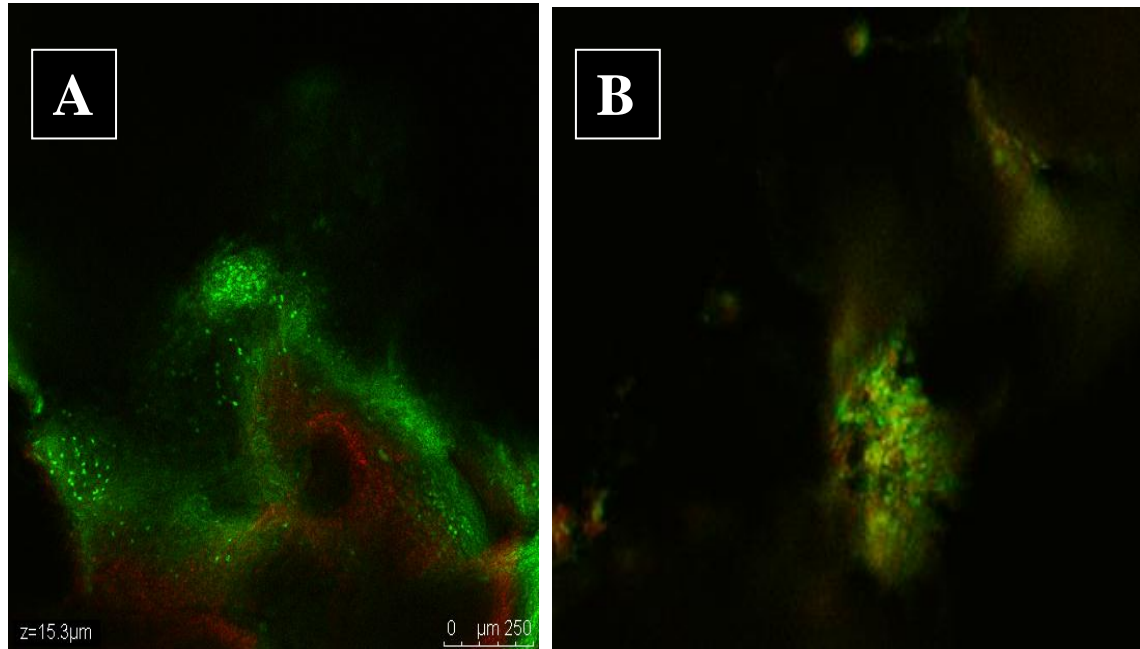


Figura 4.18 Colonización de mucosa e hidroxiapatita implantada (MCLB). Fotografías tomadas mediante MCLB en la que se observa una biopelícula con abundante desarrollo en la mucosa timpánica de la rata HA-5 (A) y un fragmento de hidroxiapatita que fue implantado en el oído medio de la misma rata (B).

Estos resultados confirman el hecho de que el biomaterial parece ofrecer cierta resistencia a la colonización respecto a la mucosa del oído medio. En todas las muestras estudiadas con MCLB se observa un predominio del color verde que indica la presencia de bacterias viables de membrana íntegra.

V DISCUSIÓN.

5 DISCUSIÓN.

La creación de este modelo experimental pretende demostrar la posibilidad del desarrollo de biopelículas bacterianas en oídos hipoventilados y que han sido infectados con una solución bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*. Sería de gran utilidad para el estudio de las biopelículas, incluyendo las distintas fases de formación y desarrollo, nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento y cualquier otro aspecto fisiopatológico relacionado con las biopelículas bacterianas.

Este modelo experimental comenzó a plantearse a raíz de los trabajos sobre biocompatibilidad en el oído medio del animal de experimentación del Servicio de ORL del Hospital Puerta de Hierro, a finales de los años 90 y primeros años del 2000. Tras la creación de los modelos experimentales de otitis media serosa y bacteriana, se describieron los cambios histopatológicos que se producían en el oído medio del animal de experimentación y en distintos biomateriales, al someter el oído a una situación de hipopresión permanente, con y sin la inoculación de una solución de *Pseudomonas aeruginosa* (11), (112). Aunque ya había sido descrita la existencia de las biopelículas bacterianas muchos años antes, coincidiendo con el desarrollo de los modelos de otitis media, se produce un gran avance en el conocimiento de las biopelículas dentro de la medicina. Por una parte, se desarrolla la teoría de las biopelículas y se pone de manifiesto su ubicuidad en la naturaleza (46). Por otra parte, comienzan a describirse biopelículas bacterianas implicadas de una u otra forma en un número creciente de enfermedades humanas y en el fallo de diversos biomateriales usados como dispositivos médicos. Además, la bacteria utilizada en el modelo de otitis media, la *Pseudomonas aeruginosa*, es la

especie bacteriana más estudiada por su capacidad para generar biopelículas. La explicación a este fenómeno se encuentra en su patogenicidad y en que comenzó a estudiarse inicialmente, tras aislarse en las secreciones infectadas de pacientes con fibrosis quística.

La patología otológica, por sus condiciones anatómicas y su comunicación directa con la nasofaringe a través del conducto de la trompa de Eustaquio, parece un órgano ideal para el desarrollo de biopelículas bacterianas. En el oído medio son frecuentes las enfermedades de difícil control médico, infecciones de repetición y entidades que tienden a la cronicidad. También son frecuentes los fallos de dispositivos médicos como, por ejemplo, las prótesis utilizadas en la reconstrucción osicular o para mejorar la ventilación del oído medio.

En resumen, el prevalente problema clínico no resuelto de la otitis media crónica y el gran auge de las biopelículas bacterianas, nos impulsaron a comprobar si el fiable modelo de otitis media bacteriana que había sido desarrollado, era también válido para la formación de biopelículas en el oído medio de la rata Wistar. Para ello hubo que introducir algunas modificaciones, especialmente en la forma de detección y procesamiento de las muestras, que se han explicado de forma más detallada en el apartado de Material y Métodos.

5.1. ELECCIÓN DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

La rata Wistar es un animal ampliamente utilizado para el estudio de numerosas patologías por sus semejanzas con la fisiopatología humana. También ha sido empleado para el estudio de patología otológica, en concreto, para el estudio de la otitis media aguda y serosa. La rata presenta varias semejanzas con la anatomía humana, como son una otoscopia y oído medio similares. Además, tiene una estructura y posición de la trompa de Eustaquio, claves en la fisiopatología de la otitis media, parecidas a las de la trompa humana. La rata presenta una cavidad timpánica pequeña y una trompa de Eustaquio más horizontal que la de la chinchilla o el gerbo. Existen diversos abordajes descritos para acceder al oído medio de la rata y varias técnicas para la obstrucción de la trompa de Eustaquio (113,114).

Los primates también han sido utilizados para el estudio de la formación de biopelículas en el oído medio (105). Dadas sus semejanzas con el hombre, podría ser considerado el modelo más aplicable a la patología humana. Sin embargo, los primates tienen un mayor coste económico. Por el contrario, la rata es un animal accesible en investigación, barato, resistente y de fácil manejo, incluso por una sola persona.

El animal más utilizado en el estudio de biopelículas otógenas es la chinchilla. Al igual que la rata, la chinchilla es un animal fácilmente manipulable. Sin embargo presenta el inconveniente de que, a diferencia del oído humano, el de la chinchilla está tabicado, por lo que la colonización de las biopelículas podría alterarse. Además, la chinchilla presenta una cavidad timpánica comparativamente grande y una trompa de Eustaquio funcionalmente diferente

a la humana que, como hemos visto en la introducción, juega un papel crucial en la fisiopatología de muchas de las patologías del oído medio (115).

Se emplearon ratas jóvenes hembras de entre 120 y 200 gramos de peso, por razones de disponibilidad del animalario, para facilitar el manejo de los animales (por encima de ese peso, la anestesia intraperitoneal dura menos y precisan nuevas inyecciones con el consiguiente riesgo de complicaciones) y minimizar la posibilidad de otitis media espontánea previa.

5.2. ELECCIÓN DE LA BACTERIA DE EXPERIMENTACIÓN.

La bacteria empleada fue la *Pseudomonas aeruginosa* cepa 27853 de la ATCC. La *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria ampliamente estudiada por su capacidad para la formación de biopelículas, no sólo en el ámbito de la otorrinolaringología sino también en infecciones pulmonares y odontógenas, entre otras. Además es el patógeno bacteriano más frecuentemente aislado en los pacientes que tiene otitis media crónica supurada (116).

Otros modelos de experimentación han empleado bacterias como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* en chinchilla y la cepa PITT27853 de *Pseudomonas aeruginosa* en primates.

La elección de la cepa comercial 27853 de la ATCC se debió a su capacidad previamente demostrada de producir otitis media aguda y crónica en ratas Wistar (109). Aunque las cepas obtenidas a partir de infecciones humanas tienen mayor virulencia y mayor probabilidad de formación de biopelículas, requieren la realización de cultivos celulares que son más susceptibles de contaminación o mutación. Sin embargo, las cepas comercializadas presentan algunas ventajas respecto a las cepas obtenidas a

partir de infecciones reales de pacientes, como son su fácil accesibilidad, la reproducibilidad de los experimentos y su menor tasa de mutación. La bacteria empleada en el presente trabajo es una cepa de baja virulencia apta para su utilización experimental. Dada la escasa virulencia de la cepa utilizada y, al igual que en el modelo experimental de otitis media, fue necesario inocular un elevado volumen bacteriano. A pesar de ello ninguna de las ratas empleadas en el estudio tuvo problemas derivados de infecciones graves sistémicas ni requirieron ningún tipo de tratamiento antibiótico. A diferencia de otros modelos de biopelículas bacterianas, no fue necesaria la administración de antibióticos profilácticos para evitar infecciones graves o complicaciones relacionadas con la inoculación. De esta forma, no alteramos el desarrollo de biopelículas en el oído medio.

5.3. BIOMATERIALES EMPLEADOS.

Para el estudio de la colonización de biomateriales en el oído medio de la rata se emplearon fragmentos de hidroxipatita y de titanio. Se trata de dos de los biomateriales más utilizados hoy día en el ámbito de la otología. Se usan con frecuencia en prótesis de reemplazo osicular y drenajes transtimpánicos. Otros biomateriales como el Plastipore o el Proplast han dejado de utilizarse debido a sus problemas de compatibilidad. El Plastipore se introdujo en el año 1978 y, en cierta forma, suplió al Proplast que presentaba un alto índice de deformaciones al utilizarse como prótesis de reemplazo osicular. El Plastipore, por su parte, tiene un alto índice de fracaso debido a la generación de reacciones de cuerpo extraño y extrusiones, especialmente en oídos hipoventilados e infectados (117).

5.4. TÉCNICA QUIRÚRGICA.

5.4.1. Anestesia.

El proceso de anestesia utilizado, a través de la infiltración de una solución de atropina, ketamina y diazepam intraperitoneal, es sencillo, rápido y puede ser realizado sin necesidad de conocimientos avanzados de anestesiología. Esto permite que todo el procedimiento anestésico y quirúrgico pueda ser realizado por una sola persona. Además es rápidamente reversible sin provocar consecuencias para el animal de experimentación. Con la solución administrada, a las dosis adecuadas, se logra una anestesia del animal de experimentación que dura en torno a 35-40 minutos, tiempo suficiente para la realización de todo el procedimiento.

5.4.2. Cauterización de la Trompa de Eustaquio.

La disfunción tubárica se considera un elemento clave en el desarrollo de todos los tipos descritos de otitis media, incluida la otitis media crónica. Los modelos de biopelículas en oído medio de primates y chinchilla no emplean ningún tipo de técnica para lograr este objetivo. A pesar de que en estos modelos se aprecia la presencia de biopelículas tras la inoculación bacteriana, la disfunción tubárica permanente que se logra con este modelo simula, de forma más precisa, la alteración crónica que presentan los enfermos y podría ser un elemento favorecedor en la persistencia de bacterias en forma de biopelícula.

La cauterización de la trompa de Eustaquio es un procedimiento que intenta inducir una disfunción irreversible, sin alterar la continuidad de la misma. Existen diversas técnicas descritas en los distintos modelos de otitis

media en roedores que utilizan abordajes abiertos o cerrados, con o sin interposición de estructuras, con el objetivo de bloquear la trompa de Eustaquio. La técnica empleada en este modelo es sencilla, rápida y no agresiva, de forma que raramente compromete la vida del animal. Además y a diferencia de otras técnicas empleadas en otros modelos experimentales de otitis media, el animal puede deglutir y alimentarse sin dificultad. La disfunción tubárica que se produce en este modelo provoca cambios histológicos en el oído medio de la rata similares a los que ocurren en la OMS humana. Además, no oblitera el conducto de la Trompa de Eustaquio, por lo tanto podría producirse el hipotético paso de patógenos hacia el oído medio (114).

5.4.3. Abordaje quirúrgico del oído medio.

La vía cervical de abordaje del oído medio de la rata es un procedimiento relativamente fácil de realizar, no dificultado por la existencia de estructuras importantes. Permite el abordaje de la bulla timpánica a través del hipotímpano. Se trata de una zona de hueso débil en ratas que no han sufrido otitis previas, fácilmente vulnerable con instrumentos sencillos como un punzón o un bisturí falciforme. Mediante este abordaje preservamos intacta la membrana timpánica del animal evitando favorecer de forma extrínseca supuraciones secundarias a la infección y sin alterar la otoscopia previa al sacrificio. La creación de un orificio de escasos milímetros es suficiente para la inoculación de la solución bacteriana. El cierre y cicatrización mediante tejido fibroso en el punto de inoculación fue constante y tiene un bajo riesgo de infección en los tejidos cervicales, ya que no se observaron alteraciones en ninguno de los animales estudiados.

Es aconsejable la utilización de una lupa o microscopio quirúrgico durante el abordaje cervical del oído medio y para el sacrificio y la toma de muestras. El resto del material quirúrgico empleado es material básico habitual en las unidades de cirugía experimental.

5.5. HALLAZGOS OTOMICROSCÓPICOS.

La visualización de la membrana timpánica del animal de experimentación, previa al sacrificio, sugiere el predominio de fenómenos inflamatorios en los animales sacrificados a los 7 días, con una tendencia a la desaparición de los mismos posteriormente. Por el contrario, los animales sacrificados a partir de los 15 días, muestran hallazgos compatibles con la existencia de una otitis serosa persistente y mayor número de complicaciones como las retracciones timpánicas.

En el caso de los animales inoculados con la solución de *Pseudomonas aeruginosa* que fueron implantados con titanio o hidroxiapatita y sacrificados a los 7 días, los hallazgos son superponibles a los de los animales no implantados y sacrificados en la misma fecha. Esto sugiere que los hallazgos otomicroscópicos no se ven alterados de forma importante por la existencia de materiales extraños al organismo en el oído medio de la rata.

En este estudio no se han detectado extrusiones del material sintético colocado en la caja timpánica, a diferencia de lo publicado por Trinidad y cols (117). Entre las posibles explicaciones para no observar este fenómeno consideramos la mejoría en la biocompatibilidad de los materiales actuales respecto a otros como el Plastipore, el corto tiempo de incubación o la ubicación del biomaterial durante la cirugía. Al introducir biomateriales en el

oído de la rata, el objetivo era visualizar si se producía la colonización de los mismos y comparar la extensión bacteriana entre los tejidos vivos como la mucosa de la rata y las superficies inertes. Por ello, los fragmentos de titanio o hidroxiapatita se colocaban de forma libre en la cavidad timpánica, y no necesariamente en contacto con la membrana timpánica, por lo que los fenómenos de integración en el organismo del animal de experimentación y, por tanto, la posibilidad de reacciones de cuerpo extraño eran menos probables.

5.6. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Los estudios microbiológicos realizados tienen como objeto la determinación de los agentes que componen las biopelículas bacterianas. Así se intentan identificar posibles ratas que hubiesen desarrollado biopelículas por bacterias diferentes a la *Pseudomonas aeruginosa* inoculada. De esta forma, una contaminación durante el procedimiento quirúrgico, la existencia de una otitis media previa espontánea no detectada antes del procedimiento quirúrgico o el desarrollo de infecciones otógenas por microorganismos que pudiesen ascender a través de la TE electrocoagulada, serían detectados. Los cultivos microbiológicos realizados tras el sacrificio del animal de experimentación mostraron en todos ellos la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Los estudios realizados en el Centro de Microbiología del Instituto de salud Carlos III de Majadahonda fueron diseñados para comprobar una hipótesis propuesta inicialmente por algunos investigadores. Se trata de la presencia de supuestas mutaciones en el material genético bacteriano que inducirían el cambio de la forma planctónica a la forma sésil. Sin embargo, los estudios realizados

confirman la presencia de la misma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* con un material genético igual a la inoculada descartándose, por tanto, la contaminación o la existencia de cambios genéticos entre la bacteria inoculada y la obtenida del oído medio tras el sacrificio de la rata. Estos datos confirmarían que la forma sésil no difiere en su estructura genética respecto a la forma planctónica, aunque sí que modifica su expresión.

5.7. MÉTODO DE DETECCIÓN DE BIOPELÍCULAS.

Los datos aportados por las distintas técnicas de microscopía de barrido han permitido la detección de tejidos biológicos colonizados por biopelículas. Las principales técnicas empleadas hoy día son la microscopía confocal láser (MCLB), la microscopía electrónica de transmisión (MET), la microscopía de barrido (MEB) y la microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA). Otras técnicas, como la microscopía óptica, son menos utilizadas, debido a la calidad de las imágenes que proporcionan. Además, la utilización de estas técnicas ha permitido el avance en el estudio de la disposición y estructura de las biopelículas.

El estudio con MCLB proporciona una visión tridimensional del conjunto. La utilización de fluorescencia ha permitido visualizar e identificar biopelículas formadas por un agente específico. Además, usando tinciones con agentes cromóforos, se pueden diferenciar bacterias vivas y muertas dentro de las biopelículas. Se trata de una técnica sencilla de realizar que requiere un pequeño procesamiento de las muestras a estudiar. A diferencia del resto de técnicas microscópicas, permite visualizar el interior de la biopelícula al realizar

secciones ópticas de la muestra. Utilizando determinados programas informáticos es posible cuantificar la población bacteriana. Entre las desventajas que presenta este método consideramos, por un lado, la escasez de microscopios con esta tecnología, por lo que el estudio resulta caro y de difícil acceso en España y, por otro lado, que las imágenes que obtenemos no permiten la visualización de la superficie de la biopelícula, más concretamente de la matriz extracelular. De esta forma se pierde una parte muy importante de la información, ya que la matriz extracelular juega un papel crucial en la resistencia bacteriana.

Los estudios con MEB y MET son técnicas accesibles y baratas para la mayoría de los grupos de investigación. Proporcionan imágenes detalladas de las células que forman las biopelículas. Aunque son procedimientos aceptados para la detección de biopelículas, presentan algunos inconvenientes respecto a las otras técnicas que limitan su uso. Como se explica en el apartado de introducción, el estudio de muestras biológicas con MEB y MET requiere cierto procesamiento de las mismas, lo que implica que las muestras no pueden estudiarse en fresco y que durante esta manipulación se produce la alteración del glucocálix y la introducción de artefactos, lo que limita su uso en la práctica clínica. Es decir, las condiciones de estudio en el microscopio son distintas a las del ambiente natural de la muestra. El procesamiento de las muestras biológicas para el MET y el MEB incluye la deshidratación y la metalización de las mismas. Teniendo en cuenta que un alto porcentaje de la biopelícula, cercano al 90%, está compuesta por agua, especialmente la matriz extracelular, concluimos que, al igual que el MCLB, ni el MET ni el MEB son

buenos métodos para el estudio del glucocálix de la biopelícula, debido a la distorsión que se produce durante el procesamiento de las muestras hidratadas. Otra limitación de estas técnicas es que no permiten la identificación de los microorganismos que componen la biopelícula.

	MET	MEB	MEBA	MCLB
Procesamiento	Deshidratación Metalización	Deshidratación Metalización	No precisa	Fluoróforos
Artefactos	Sí	Sí	No	No
Resolución	Alta	Alta	Alta	Alta
Apariencia tridimensional	No	Sí	Sí	Sí
Viabilidad bacteriana	No	No	No	Sí
Identificación bacteriana	No	No	No	No
Objetivo de estudio	Estructura celular	Superficie celular	Glucocálix	Viabilidad bacteriana

TABLA 5.1 Métodos de microscopía electrónica para detectar biopelículas.

El MEBA es una variedad de microscopía de barrido tradicionalmente utilizada en la industria, que ha sido introducido por nuestro grupo para la detección de biopelículas en investigación médica (82,85). Se trata de una técnica que permite el estudio de tejidos biológicos y materiales in vivo sin

ningún tipo de procesamiento de la muestra. La muestra es recogida en suero salino o agua estéril y colocada directamente en la cámara de vacío del microscopio para su estudio. Esto permite minimizar al máximo la introducción de artefactos. Además tiene la capacidad de observar la muestra con distintos grados de deshidratación sin alterar la misma; esta propiedad es especialmente importante para determinar la ultraestructura de las biopelículas, ya que el principal componente de estos agregados bacterianos es el agua. La principal desventaja con respecto al uso del MCLB es que no permite diferenciar entre bacterias vivas y muertas, la imposibilidad de identificar las cepas bacterianas que forman la biopelícula y la falta de medios objetivos para la cuantificación bacteriana. En este estudio se han intentado minimizar estas limitaciones mediante el cultivo bacteriano posterior al sacrificio de los animales de experimentación y mediante los estudios microbiológicos que permitían identificar la cepa bacteriana a partir de las muestras obtenidas tras el sacrificio de las ratas.

Creemos que este método es sencillo, rápido, preciso y relativamente barato, por lo que podría ser un sistema útil para su uso en la investigación de biopelículas, incluso para su uso habitual en el ámbito clínico. Además, es la técnica microbiológica que muestra con mayor precisión la arquitectura externa y la superficie de la biopelícula, especialmente la estructura de la matriz extracelular. Por lo tanto, consideramos este método fundamental para el estudio de las biopelículas, sobre todo cuando nos centramos en la capacidad de resistencia que proporciona el glucocálix de la biopelícula.

Como conclusión final, consideramos que las técnicas clásicas microbiológicas utilizadas hasta hace unos años son inexactas para el estudio

de las infecciones persistentes mediadas por biopelículas. Las técnicas microscópicas proporcionan mayor resolución. En cuanto a la variedad de técnicas microscópicas disponibles, consideramos el MCLB y el MEBA como las técnicas básicas para el estudio de las biopelículas en tejidos vivos. No hay una técnica claramente superior al resto, sino que proporcionan distintos puntos de vista de un mismo fenómeno, es decir, son complementarias.

5.8. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE BIOPELÍCULAS.

El método utilizado para medir biopelículas consiste en la visualización y rastreo de la muestra mediante MEBA y MCLB, y la cuantificación ha sido realizada por dos investigadores en todos los casos. Hay que tener en cuenta que las muestras analizadas corresponden a fragmentos de escasos milímetros extraídos de zonas del oído medio de la rata, y que dichos fragmentos se obtuvieron de zonas con hipertrofia de mucosa, que fueron detectadas mediante el microscopio convencional durante el sacrificio de las ratas. Por tanto, las muestras podrían no ser totalmente representativas de la colonización global del oído medio. Por otra parte, la cuantificación de la colonización bacteriana se trata de una impresión visual subjetiva. Ninguno de los modelos de biopelículas en animales de experimentación que han sido revisados para la presente publicación, tiene otros métodos objetivos de medida, por lo que son necesarios desarrollar métodos más precisos para poder comparar fiablemente los resultados. Existen diversos trabajos aislados de investigación *in vitro* que cuantifican biopelículas utilizando técnicas microbiológicas y metabólicas como tinciones con colorantes como el violeta de genciana en placas de microvaloración (118), la reacción en cadena de la

polimerasa (RCP), ATP bioluminiscencia, así como técnicas de Resonancia nuclear magnética (RNM).

Aunque la mayoría de publicaciones sobre biopelículas bacterianas en el campo de la otorrinolaringología no presentan métodos microscópicos objetivos de medida, en los últimos años se han desarrollado diversos programas informáticos (COMSTAT, ISA3D) que cuantifican biopelículas utilizando diversos parámetros obtenidos del MCLB (119),(120). Debido a la falta de disponibilidad y a que el objetivo principal de esta tesis doctoral era describir el estudio de biopelículas mediante MEBA y no el uso del MCLB, no se utilizó ningún método objetivo de medida con esta última técnica microscópica.

Durante el proceso de revisión bibliográfica para la realización de esta publicación, no hemos encontrado métodos objetivos de medida de biopelículas aplicables al MEBA. El desarrollo de métodos fiables de medida permitiría ampliar la utilidad de este microscopio con fines investigadores.

5.9. RESULTADOS DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

5.9.1. Resultados de la microscopía electrónica en ratas inoculadas.

La mayoría de las muestras estudiadas mediante MEBA mostraron la existencia de biopelículas al menos en alguna de las zonas estudiadas. Sin embargo, la extensión de dicha afectación y el grado de desarrollo de las biopelículas fueron muy variables.

Tan sólo tres de las ratas pertenecientes al grupo de ratas inoculadas en las que no se implantó ningún biomaterial, mostraron una escasa o inexistente colonización bacteriana. Es decir, en términos porcentuales aproximadamente el 87% de los animales estudiados mostraron al menos cúmulos aislados de bacterias en forma de biopelículas. Estos datos no son bien recogidos por algunos de los modelos animales de biopelículas en oído medio. Hoa y cols. estudiaron el desarrollo de biopelículas en el oído medio de chinchillas inoculadas con virus Influenzae A y posteriormente con *Streptococcus Pneumoniae*. Los resultados que obtuvieron muestran un 67% de oídos con biopelículas del total de oídos infectados (100).

Otros autores constatan diferencias en la colonización del oído en función del período de incubación. De esta forma, cuanto más tiempo se retrasa el sacrificio del animal inoculado, se produce una pérdida de la robustez de las biopelículas (97).

Aunque el objetivo principal y, por tanto, el diseño de este estudio no era el de definir la cronología en la formación de biopelículas, se puede intuir un mayor desarrollo de biopelículas inicialmente en las ratas sacrificadas a los 7 días. Posteriormente, se produce una tendencia a la disminución en la densidad y desarrollo de biopelículas a partir de los 15 días. Por tanto, los

resultados obtenidos son concordantes con los descritos en los modelos de chinchilla, donde se fija el comienzo del desarrollo de biopelículas aproximadamente a las 24 horas de la inoculación, obteniéndose imágenes de biopelículas maduras a partir de los 5 días de la inoculación. Dichas biopelículas aumentan progresivamente su complejidad hasta el día 10, para reducir el grado de desarrollo posteriormente. Hay que tener en cuenta que estos períodos de tiempo pueden no ser completamente superponibles, al haber sido realizados en chinchilla sin disfunción tubárica y con *Haemophilus influenzae* obtenido de un paciente con otitis como agente inoculado (97).

5.9.2. Resultados microscopía electrónica en ratas inoculadas e implantadas con biomateriales.

El titanio y la hidroxiapatita son dos biomateriales ampliamente utilizados en distintas disciplinas médicas, entre ellas en otología donde forman parte de multitud de prótesis como los drenajes transtimpánicos o las prótesis de reconstrucción osicular. En la mayoría de dispositivos hechos con estos materiales, implantados en pacientes y retirados por presentar infecciones de repetición, extrusión o intolerancia, se puede observar un importante grado de desarrollo de biopelículas (figura 1.2).

Los modelos de biopelículas en oído medio presentados hasta ahora realizan la inoculación bacteriana mediante inyección con una aguja fina a través de la membrana timpánica o de la bulla timpánica. Por lo tanto, permiten la formación y el estudio de biopelículas sobre la mucosa de la caja timpánica, pero no es posible el estudio simultáneo de biomateriales. El modelo aquí descrito permitiría implantar cómodamente biomateriales y analizar las causas

del fracaso, mejorar el diseño de las prótesis, ensayar tratamientos específicos, como el recubrimiento de las prótesis con sustancias antiadherentes o la administración simultánea de fármacos antibacterianos para mejorar el resultado de estos dispositivos.

El estudio de las ratas inoculadas e implantadas con biomateriales muestra la colonización de dichos materiales por biopelículas. Los resultados en este caso fueron, en cierta forma, inesperados. La idea inicial era que los biomateriales iban a mostrar una extensa colonización por biopelículas, al tratarse de cuerpos extraños para el organismo animal. Sin embargo y como puede observarse en nuestros resultados, la colonización fue mayor en la mucosa del oído infectado que en el propio biomaterial. De esta forma, mientras la mucosa de la rata mostraba un gran desarrollo de biopelículas maduras que apenas dejaban ver la superficie de mucosa normal, el material presentaba escasos cúmulos bacterianos. Es decir, existe una cierta resistencia del material a la colonización bacteriana.

Al igual que se sugiere en otros estudios con biomateriales (85,94), parece que el desarrollo de biopelículas se ve favorecido por la existencia de grietas y zonas de debilidad del biomaterial. Al haberse utilizado fragmentos de biomateriales cortados de prótesis reales, observamos una mayor colonización en las zonas de ruptura que son zonas irregulares. Esto es especialmente importante a la hora del diseño de la prótesis e incluso durante la manipulación por el cirujano o ayudantes antes de su implantación.

Aunque el número de ratas estudiadas no es demasiado elevado, se observa una mayor colonización sobre los fragmentos de hidroxiapatita. Este resultado, unido a que la colonización del resto de la mucosa del oído medio

resultó ser muy similar en ambos grupos de animales, sugiere una mayor tendencia a la colonización de la hidroxiapatita con respecto al titanio. Esto ya ha sido sugerido en otros estudios con biomateriales (121).

5.10. MODELO DE BIOPELÍCULAS EN EL OÍDO MEDIO DE LA RATA.

Como se demostró en un trabajo previo (11), la inoculación bacteriana por vía cervical, en el oído medio de la rata Wistar, sometida a una situación de hipopresión secundaria a la cauterización eléctrica de la trompa de Eustaquio, permite intuir los cambios que se producen en el oído medio humano infectado. Las variaciones respecto al modelo de otitis media experimental que presentamos en este trabajo, nos ha permitido avanzar en el conocimiento de la otitis media humana en distintos aspectos.

En primer lugar, hemos demostrado que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada en el modelo de otitis media es capaz de desarrollar biopelículas en el oído medio de la rata. De forma similar, permitiría demostrar la capacidad de otras cepas bacterianas de colonizar tejido vivo en forma de biopelículas. Además, puede ayudar a determinar aspectos morfológicos y fisiopatológicos relacionados con estas formas de infección, que pueden ser análogas a otras patologías del área otorrinolaringológica y de otros campos de la medicina.

	Post et al.	Hoa et al.	Dohar et al.	Ke Z et al.	Chaney et al.	Modelo actual.
Año	2001,2002	2009	2005	2011	2011	2012
Animal	Chinchilla	Chinchilla	Mono	Rata	Rata	Rata
Anestesia	Intramuscular	Sedación	General	Desconocida	Intraperitoneal	Intraperitoneal
Inoculación previa	No	Influenza A	No	No	No	No
Bacteria	<i>Haemophilus influenza</i> (paciente)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (paciente)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (comercial)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (comercial)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (comercial)
Vía inoculación	Punción transbullar	Nasal	Transtimpánica	Punción transbullar	Nasal	Cervical
Bloqueo TE	No	No	No	No	No	Sí
Detección	MEB, MCLB	MEB	MEB	MEB, MCLB	M. óptica.	MEBA, MCLB
% colonización	Desconocido	67	Desconocido	Desconocido	25	87
Método medida	Subjetivo	Subjetivo	Subjetivo	Subjetivo	Subjetivo	Subjetivo

TABLA 5.2 Comparación entre los modelos experimentales de biopelículas publicados en oído medio. (M. óptica: Microscopía óptica).

La formación de biopelículas utilizando el método descrito en esta publicación es un método sencillo y barato. Además, como ya se ha explicado, el oído de la rata, a diferencia de la chinchilla, es anatómicamente y fisiológicamente análogo al oído medio humano. Los hallazgos obtenidos en primates respecto a los de los roedores, son más aplicables a los humanos, sin embargo la utilización de este tipo de animales implica la necesidad de tener una mayor infraestructura además de encarecer el coste de los estudios.

La inoculación bacteriana utilizando el abordaje cervical es técnicamente algo más complicada que la punción transbullar o la inoculación bacteriana por vía nasal. Sin embargo, permite asegurar la llegada íntegra de la solución bacteriana deseada al oído medio de una forma rápida y en un único procedimiento. Además, este abordaje es el único que permite la introducción de biomateriales para el estudio de su colonización y la posibilidad de realizar modificaciones en los mismos con el objetivo de mejorar sus resultados.

La cauterización de la TE simula la disfunción de la TE que presentan los pacientes con patología otológica subaguda y crónica y puede favorecer la persistencia de las biopelículas bacterianas

Como desventajas de este método respecto a otros modelos consideramos la dificultad para determinar la cepa bacteriana que conforma la biopelícula y su viabilidad. Además, y al igual que en el resto de modelos, no existe un método de medida objetivo del grado de colonización de las muestras estudiadas. Esto dificulta la comparación entre los distintos modelos existentes y la evaluación de los resultados de futuras investigaciones dirigidas a tratamientos que reduzcan la colonización bacteriana por estas formas de resistencia.

La principal aportación del modelo y, más concretamente del método de detección utilizado (MEBA), es el estudio de la matriz extracelular de la biopelícula intacta y en las mismas condiciones a las existentes en su medio natural, en este caso, en el oído medio de la rata. En consecuencia, proporciona información muy valiosa respecto a la estructura de la biopelícula. Los últimos estudios sugieren que la matriz extracelular es clave en la resistencia bacteriana de la colonia (122), por lo que el MEBA aporta datos sobre esta zona de la biopelícula que ninguna otra técnica puede proporcionar. Existen numerosos estudios que tratan de utilizar fármacos capaces de eliminar las biopelículas. Un grupo de ellos son sustancias que tratan de destruir la matriz extracelular, o facilitar la entrada de los antibióticos al interior de la biopelícula. Algunos de estos trabajos son *in vitro* o utilizan técnicas microscópicas que se limitan a cuantificar el efecto sobre la bacteria. La utilización del MEBA, en un modelo como el nuestro, aportaría imágenes no sólo de la afectación celular, sino sobre todo, del daño producido a la matriz extracelular de la biopelícula en el oído medio de un animal análogo al oído medio humano.

VI CONCLUSIONES.

6 CONCLUSIONES.

1. La Cauterización de la trompa de Eustaquio y la inoculación en el hipotímpano de la rata de la solución de *Pseudomonas aeruginosa*, mediante el abordaje cervical descrito, provoca el desarrollo de biopelículas bacterianas, consituyendo un modelo experimental fiable y válido.
2. El modelo experimental presentado permite el estudio cronológico y topográfico del desarrollo de biopelículas bacterianas sobre el oído medio, observándose formaciones bacterianas con alto grado de complejidad a los 7 días de la inoculación y disminuyendo la colonización posteriormente.
3. El modelo de biopelículas en oído medio de rata Wistar permite el estudio de la colonización de biomateriales en una situación similar a la que se produce en el oído medio humano.
4. En las muestras estudiadas, se detecta una escasa colonización bacteriana sobre los biomateriales, comparado con la colonización de la mucosa del oído medio del animal de experimentación. Además, se observa una mayor tendencia a la colonización sobre la superficie de la hidroxiapatita frente al titanio.

5. El Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental es un método válido para el estudio de biopelículas bacterianas. A diferencia de otros métodos microscópicos, permite el estudio de tejidos vivos e inertes en su ambiente natural, con escaso riesgo de introducción de artefactos.

6. El Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental, por su capacidad de visualizar muestras hidratadas, es un método ideal para el estudio de la superficie de la biopelícula, más concretamente de la matriz extracelular, por tanto complementa la información aportada por otros métodos microscópicos. Consideramos que es la técnica de elección para el estudio de la matriz extracelular.

VII BIBLIOGRAFÍA.

7 BIBLIOGRAFÍA.

1. e-medicine.medscape [sede Web]*. New York: Isaacson G; 2010 [actualizado 8 de diciembre de 2010; acceso 10 de enero de 2012]. Otitis Media. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/994656-overview>.
2. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Management of Acute Otitis Media. Diagnosis and management of acute otitis media. *Pediatrics*. 2004; 113(5): 1451–65.
3. Cáceres Udina MJ, Alvarez Martínez JA, Argente del Castillo J, Chumilla Valderas MA, Fernández Alvarez E, Garrido Romera A, et al. Incidencia, contaminación ambiental y factores de riesgo de otitis media aguda en el primer año de vida: estudio prospectivo. *An Pediatr (Barc)*. 2004; 60(2): 133–8.
4. Smith JA, Danner CJ. Complications of chronic otitis media and cholesteatoma. *Otolaryngol. Clin. North Am*. 2006; 39(6): 1237–55.
5. Fireman P. Otitis media and eustachian tube dysfunction: connection to allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol*. 1997; 99(2): S787–797.
6. Broides A, Dagan R, Greenberg D, Givon-Lavi N, Leibovitz E. Acute otitis media caused by *Moraxella catarrhalis*: epidemiologic and clinical characteristics. *Clin. Infect. Dis*. 2009; 49(11): 1641–7.
7. Pettigrew MM, Gent JF, Pyles RB, Miller AL, Nokso-Koivisto J, Chonmaitree T. Viral-bacterial interactions and risk of acute otitis media complicating upper respiratory tract infection. *J. Clin. Microbiol*. 2011; 49(11): 3750–5.
8. Paparella MM, Schachern PA, Yoon TH, Abdelhammid MM, Sahni R, da Costa SS. Otopathologic correlates of the continuum of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*. 1990; 148: 17–22.
9. Slattery WH. Pathology and clinical course of inflammatory diseases of the middle ear. En Glasscock ME y Shambaugh GE, editors. *Surgery of the ear*, 4^a ed. Philadelphia: WB Saunders Company 1990. p. 167-93.
10. Paparella MM, Schachern PA, Cureoglu S. Chronic silent otitis media. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec*. 2002; 64(2): 65–72.
11. Trinidad A. Biomateriales de reemplazo osicular: interacción con los tejidos vivos en el oído medio infectado del animal de experimentación: Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Madrid. 2004.
12. Bluestone CD. Studies in otitis media: Children's Hospital of Pittsburgh-University of Pittsburgh progress report--2004. *Laryngoscope*. 2004; 114(11 Pt 3 Suppl 105): 1–26.
13. Dowell SF, Butler JC, Giebink GS, Jacobs MR, Jernigan D, Musher DM, et al. Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal

- resistance--a report from the Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999; 18(1): 1–9.
14. Verhoeff M, van der Veen EL, Rovers MM, Sanders EAM, Schilder AGM. Chronic suppurative otitis media: a review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2006; 70(1): 1–12.
 15. Klein JO. Microbiologic efficacy of antibacterial drugs for acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1993; 12(12): 973–5.
 16. Cervera J, Villafruela MA, Del Castillo F, Delgado Rubio A, Rodrigo C, de Liria G, et al. Consenso Nacional sobre otitis media aguda. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2007; 58(6): 225–31.
 17. Simpson SA, Lewis R, van der Voort J, Butler CC. Oral or topical nasal steroids for hearing loss associated with otitis media with effusion in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;(5):CD001935.
 18. Rosenfeld RM, Culpepper L, Doyle KJ, Grundfast KM, Hoberman A, Kenna MA, et al. Clinical practice guideline: Otitis media with effusion. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130(5 Suppl): S95–118.
 19. Silveira Netto LF, da Costa SS, Sleifer P, Braga MEL. The impact of chronic suppurative otitis media on children's and teenagers' hearing. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2009; 73(12): 1751–6.
 20. Hendley JO. Clinical practice. Otitis media. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347(15): 1169–74.
 21. Wright D, Safranek S. Treatment of otitis media with perforated tympanic membrane. *Am Fam Physician.* 2009; 79(8): 650, 654.
 22. Cameron C, Dallaire F, Vézina C, Muckle G, Bruneau S, Ayotte P, et al. Neonatal vitamin A deficiency and its impact on acute respiratory infections among preschool Inuit children. *Can J Public Health.* 2008; 99(2): 102–6.
 23. Lee SK, Yeo SG. Relationship between pediatric obesity and otitis media with effusion. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009; 9(6): 465–72.
 24. Kerschner JE, Tripathi S, Khampang P, Papsin BC. MUC5AC expression in human middle ear epithelium of patients with otitis media. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2010; 136(8): 819–24.
 25. Post JC. Genetics of otitis media. *Adv. Otorhinolaryngol.* 2011; 70: 135–40.
 26. Ramilo O. Role of respiratory viruses in acute otitis media: implications for management. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999; 18(12): 1125–9.
 27. Hurst DS. The role of allergy in otitis media with effusion. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2011; 44(3): 637–654.

28. McNiel ME, Labbok MH, Abrahams SW. What are the risks associated with formula feeding? A re-analysis and review. *Birth*. 2010; 37(1): 50–8.
29. Strachan DP, Cook DG. Health effects of passive smoking. 4. Parental smoking, middle ear disease and adenotonsillectomy in children. *Thorax*. 1998; 53(1): 50–6.
30. Greenberg D, Hoffman S, Leibovitz E, Dagan R. Acute otitis media in children: association with day care centers--antibacterial resistance, treatment, and prevention. *Paediatr Drugs*. 2008; 10(2): 75–83.
31. Elden LM, Coyte PC. Socioeconomic impact of otitis media in North America. *J Otolaryngol*. 1998; 27 Suppl 2: 9–16.
32. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(2): 167–93.
33. Rayner MG, Zhang Y, Gorry MC, Chen Y, Post JC, Ehrlich GD. Evidence of bacterial metabolic activity in culture-negative otitis media with effusion. *JAMA*. 1998; 279(4): 296–9.
34. Bakaletz LO. Bacterial biofilms in otitis media: evidence and relevance. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2007; 26(10 Suppl): S17–19.
35. Pearson MM, Laurence CA, Guinn SE, Hansen EJ. Biofilm formation by *Moraxella catarrhalis* in vitro: roles of the UspA1 adhesin and the Hag hemagglutinin. *Infect. Immun.* 2006; 74(3): 1588–96.
36. Daines DA, Bothwell M, Furrer J, Unrath W, Nelson K, Jarisch J, et al. *Haemophilus influenzae* luxS mutants form a biofilm and have increased virulence. *Microb. Pathog.* 2005; 39(3): 87–96.
37. Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*. 2006; 296(2): 202–11.
38. Lee MR, Pawlowski KS, Luong A, Furze AD, Roland PS. Biofilm presence in humans with chronic suppurative otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 141(5): 567–71.
39. Jiang X, Pace JLMicrobial Biofilms. In John L Pace, Mark E Rupp, Roger G Finch. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Boca Raton. CRC Press Taylor & Francis Group; 2006. p 3-19
40. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 711–45.
41. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 2001; 147(Pt 1): 3–9.
42. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005; 13(1) :20–6.

43. Lewandowski Z. Dissolved oxygen gradients near microbically colonized surfaces. In: Geesey, GG, Lewandowski Z and Flemming HC, eds. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Florida. CRC-Press: 1994: 175-88.
44. Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(1): 317-23.
45. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998; 280(5361): 295-8.
46. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 1987; 41: 435-64.
47. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64(4): 847-67.
48. Huelves L, del Prado G, Rodríguez-Cerrato V, Gracia M, Cenjor C, Granizo JJ, et al. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to polystyrene plates, effect of serum on adhesion, and virulence in the gerbil otitis media model. *Microb. Pathog.* 2007; 43(2-3): 114-9.
49. Ruiz V, Rodríguez-Cerrato V, Huelves L, Del Prado G, Naves P, Ponte C, et al. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to polystyrene plates and epithelial cells and the antiadhesive potential of albumin and xylitol. *Pediatr. Res.* 2011; 69(1): 23-7.
50. Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(2): 155-66.
51. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 1998; 30(2): 295-304.
52. Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK. Molecular interactions in biofilms. *Chem. Biol.* 2002; 9(8): 859-71.
53. Smith JL, Fratamico PM, Novak JS. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *J. Food Prot.* 2004; 67(5): 1053-70.
54. Pace JL, Rupp ME, Finch RG. *Biofilms Infection and Antimicrobial Therapy*. Boca Ratón: CRC Press Taylor & Francis Group; 2006.
55. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002; 56: 187-209.
56. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 12(3): 185-90.

57. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 49–79.
58. Beikler T, Flemmig TF. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontol.* 2000. 2011; 55(1): 87–103.
59. Post JC, Hiller NL, Nistico L, Stoodley P, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 15(5): 347–51.
60. Cantón R, Morosini M-I. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 35(5): 977–91.
61. Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 32(4): 518–23.
62. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9(1): 34–9.
63. Velkov VV. Stress-induced evolution and the biosafety of genetically modified microorganisms released into the environment. *J. Biosci.* 2001; 26(5): 667–83.
64. Blázquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37(9): 1201–9.
65. Lewis K. Programmed death in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000;64(3): 503–14.
66. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318–22.
67. Gómez-Suárez C, Busscher HJ, van der Mei HC. Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(6): 2531–7.
68. Schultz MP, Bendick JA, Holm ER, Hertel WM. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling.* 2011; 27(1): 87–98.
69. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109(4): 1117–31.
70. Neut D, van der Mei HC, Bulstra SK, Busscher HJ. The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *Acta Orthop.* 2007; 78(3): 299–308.
71. Miclau T, Schmidt AH, Wenke JC, Webb LX, Harro JM, Prabhakara R, et al. Infection. *J Orthop Trauma.* 2010; 24(9): 583–6.
72. Chen L, Wen Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci.* 2011; 3(2): 66–73.

73. Ward KH, Olson ME, Lam K, Costerton JW. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *J. Med. Microbiol.* 1992; 36(6): 406–13.
74. Cochrane DM, Brown MR, Anwar H, Weller PH, Lam K, Costerton JW. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. *J. Med. Microbiol.* 1988; 27(4): 255–61.
75. Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation.* 1982; 66(6): 1339–41.
76. Post JC, Preston RA, Aul JJ, Larkins-Pettigrew M, Rydquist-White J, Anderson KW, et al. Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA.* 1995;273(20): 1598–604.
77. Dingman JR, Rayner MG, Mishra S, Zhang Y, Ehrlich MD, Post JC, et al. Correlation between presence of viable bacteria and presence of endotoxin in middle-ear effusions. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(11): 3417–9.
78. Chole RA, Faddis BT. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2002; 128(10): 1129–33.
79. Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP, Maragoudakis P, Tzagaroulakis A, Ferekidis E. Biofilms in ear, nose, and throat infections: how important are they? *Laryngoscope.* 2007;117(4): 668–73.
80. Zuliani G, Carron M, Gurrola J, Coleman C, Hauptert M, Berk R, et al. Identification of adenoid biofilms in chronic rhinosinusitis. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2006; 70(9): 1613–7.
81. Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2003; 129(6): 634–6.
82. Ramírez-Camacho R, González-Tallón AI, Gómez D, Trinidad A, Ibáñez A, García-Berrocal JR, et al. Microscopia electrónica de barrido ambiental para la detección de biopelículas en las amígdalas. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2008; 59(1): 16–20.
83. Berry JA, Biedlingmaier JF, Whelan PJ. In vitro resistance to bacterial biofilm formation on coated fluoroplastic tympanostomy tubes. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000; 123(3): 246–51.
84. Pawlowski KS, Wawro D, Roland PS. Bacterial biofilm formation on a human cochlear implant. *Otol. Neurotol.* 2005; 26(5): 972–5.
85. Ibáñez A, Trinidad A, García-Berrocal JR, Gómez D, San Román J, Ramírez-Camacho R. Biofilm colonisation in nasolacrimal stents. *B-ENT.* 2011; 7(1): 7–10.
86. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2): 95–108.

87. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357(7): 654–63.
88. Black CE, Costerton JW. Current concepts regarding the effect of wound microbial ecology and biofilms on wound healing. *Surg. Clin. North Am.* 2010; 90(6): 1147–60.
89. Costerton JW, Post JC, Ehrlich GD, Hu FZ, Kreft R, Nistico L, et al. New methods for the detection of orthopedic and other biofilm infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011; 61(2): 133–40.
90. Owens BD, White DW, Wenke JC. Comparison of irrigation solutions and devices in a contaminated musculoskeletal wound survival model. *J Bone Joint Surg Am.* 2009; 91(1): 92–8.
91. Wiles S, Robertson BD, Frankel G, Kerton A. Bioluminescent monitoring of in vivo colonization and clearance dynamics by light-emitting bacteria. *Methods Mol. Biol.* 2009; 574: 137–53.
92. Phillips DM. Electron microscopy: use of transmission and scanning electron microscopy to study cells in culture. *Methods Cell Biol.* 1998; 57: 297–311.
93. Egerton, RF. Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM. 1ª Ed. New York: Springer; 2005.
94. Trinidad A, Ibáñez A, Gómez D, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Application of environmental scanning electron microscopy for study of biofilms in medical devices. En Méndez Vilas A, Díaz J, editores. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 1ª Ed. Badajoz: Formatex Research Center; 2010. 204-10. 1).
95. Palmer RJ Jr, Sternberg C. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999; 10(3): 263–8.
96. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA.* 2002; 287(13): 1710–5.
97. Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope.* 2001; 111(12): 2083–94.
98. Giebink GS, Payne EE, Mills EL, Juhn SK, Quie PG. Experimental otitis media due to *Streptococcus pneumoniae*: immunopathogenic response in the chinchilla. *J. Infect. Dis.* 1976; 134(6): 595–604.
99. Doyle WJ, Supance JS, Marshak G, Cantekin EI, Bluestone CD, Rohn DD. An animal model of acute otitis media consequent to beta-lactamase-producing nontypable *Haemophilus influenzae*. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1982; 90(6): 831–6.

100. Hoa M, Syamal M, Sachdeva L, Berk R, Coticchia J. Demonstration of nasopharyngeal and middle ear mucosal biofilms in an animal model of acute otitis media. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2009; 118(4): 292–8.
101. Giebink GS, Berzins IK, Marker SC, Schiffman G. Experimental otitis media after nasal inoculation of *Streptococcus pneumoniae* and influenza A virus in chinchillas. *Infect. Immun.* 1980; 30(2): 445–50.
102. Tong HH, Fisher LM, Kosunick GM, DeMaria TF. Effect of adenovirus type 1 and influenza A virus on *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization and otitis media in the chinchilla. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2000; 109(11): 1021–7.
103. Dohar JE, Alper CM, Rose EA, Doyle WJ, Casselbrant ML, Kenna MA, et al. Treatment of chronic suppurative otitis media with topical ciprofloxacin. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1998; 107(10 Pt 1): 865–71.
104. Alper CM, Dohar JE, Gulhan M, Ozunlu A, Bagger-Sjobak D, Hebda PA, et al. Treatment of chronic suppurative otitis media with topical tobramycin and dexamethasone. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2000; 126(2): 165–73.
105. Dohar JE, Hebda PA, Veeh R, Awad M, Costerton JW, Hayes J, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in a nonhuman primate model of chronic suppurative otitis media. *Laryngoscope.* 2005; 115(8): 1469–72.
106. Ke Z, Yang M, Gong T, Liu M. [Feature and significance of bacterial biofilm formation in middle-ear mucosa in the rat model of acute otitis media]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2011; 46(3): 220–4.
107. Chaney EJ, Nguyen CT, Boppart SA. Novel method for non-invasive induction of a middle-ear biofilm in the rat. *Vaccine.* 2011; 29(8): 1628–33.
108. Verdaguer JM, Trinidad A, González-García JA, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Spontaneous otitis media in Wistar rats: an overlooked pathology in otological research. *Lab Anim (NY).* 2006; 35(10): 40–4.
109. Trinidad A, Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Verdaguer JM, Vicente J, Pinilla MT. *Pseudomonas aeruginosa* infection in the hypoventilated middle ear: an experimental model. *Acta Otolaryngol.* 2005; 125(3): 266–9.
110. Trinidad A, Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Verdaguer JM, Daza R. Labyrinthitis secondary to experimental otitis media. *Am J Otolaryngol.* 2005; 26(4): 226–9.
111. Llorens J, Rodríguez-Farré E. Comparison of behavioral, vestibular, and axonal effects of subchronic IDPN in the rat. *Neurotoxicol Teratol.* 1997; 19(2): 117–27.
112. Vicente J. Implantación de gore-tex y plastipore en oído medio de rata wistar sometido a hipopresión experimental: Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Madrid. 2004.

113. Pinilla M, Ramírez-Camacho R, Jorge E, Trinidad A, Vergara J. Ventral approach to the rat middle ear for otologic research. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 124(5): 515–7.
114. Vicente J, Trinidad A, Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, González-García JA, Ibáñez A, et al. Evolution of middle ear changes after permanent eustachian tube blockage. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2007; 133(6): 587–92.
115. Daniel HJ 3rd, Fulghum RS, Brinn JE, Barrett KA. Comparative anatomy of eustachian tube and middle ear cavity in animal models for otitis media. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1982; 91(1 Pt 1): 82–9.
116. Kenna MA, Bluestone CD. Microbiology of chronic suppurative otitis media in children. *Pediatr Infect Dis.* 1986; 5(2): 223–5.
117. Trinidad A, Vicente J, Verdaguer JM, Daza R, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Morphological sequence of Plastipore extrusion in experimental otitis media. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2007; 116(10): 779–84.
118. Alnnasouri M, Dagot C, Pons M-N. Comparison of four methods to assess biofilm development. *Water Sci. Technol.* 2011; 63(3): 432–9.
119. Beyenal H, Donovan C, Lewandowski Z, Harkin G. Three-dimension biofilm structure quantification. *J Microbiol Methods.* 2004; 59(3): 395-413.
120. Xavier JB, White DC, Almeida JS. Automated biofilm morphology quantification from confocal laser scanning microscopy imaging. *Water Sci. Technol.* 2003; 47(5): 31–7.
121. Jaryszak EM, Sampson EM, Antonelli PJ. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on ossicular reconstruction prostheses. *Am J Otolaryngol.* 2009; 30(6): 367–70.
122. Khan W, Bernier SP, Kuchma SL, Hammond JH, Hasan F, O'Toole GA. Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide. *Int. Microbiol.* 2010; 13(4): 207–12.

VIII ANEXO.

ANEXO I.

Ramírez-Camacho R, González-Tallón AI, Gómez D, Trinidad A, Ibáñez A, García-Berrocal JR, Verdaguer JM, González-García JA, San Román J. Microscopia electrónica de barrido ambiental para la detección de biopelículas en las amígdalas. Acta Otorrinolaringol Esp. 2008; 59(1): 16–20.

ANEXO II.

Trinidad A, Ibáñez A, Gómez D, García-Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Application of environmental scanning electron microscopy for study of biofilms in medical devices. En Méndez Vilas A, Díaz J, editores. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. 1ª Ed. Badajoz: Formatex Research Center; 2010. 204-10. 1).

ANEXO III.

Ibáñez A, Trinidad A, García-Berrocal JR, Gómez D, San Román J, Ramírez-Camacho R. Biofilm colonisation in nasolacrimal stents. B-ENT. 2011; 7(1): 7–10.

Microscopia electrónica de barrido ambiental para la detección de biopelículas en las amígdalas

Rafael Ramírez-Camacho^a, Ana Isabel González-Tallón^a, David Gómez^b, Almudena Trinidad^a, Andrés Ibáñez^a, José Ramón García-Berrocal^a, José María Verdaguer^a, José Ángel González-García^a y Julio San Román^b

^aGrupo de Investigación Otológica. Servicio de Otorrinolaringología. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid. España.

^bInstituto de Química Orgánica Lora-Tamayo. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid. España.

Introducción y objetivo: Describir un método ambiental con microscopio electrónico de barrido para el estudio de biopelículas en muestras clínicas. Se realiza una comparación con la microscopia electrónica de barrido convencional.

Pacientes y método: Se intervino de amigdalectomía a 9 pacientes con antecedentes de amigdalitis de repetición. Se obtuvieron muestras de cada uno para microscopia electrónica de barrido tanto convencional como ambiental. Como controles se empleó las amígdalas extirpadas de 2 pacientes intervenidos por síndrome de apnea del sueño.

Resultados: De las 9 amígdalas, 8 mostraron biopelículas en su superficie. La microscopia electrónica de barrido convencional mostró acumulaciones de bacterias cubiertas de estructuras fibrilares, originadas en el procedimiento de deshidratación de las muestras. La técnica ambiental proporcionó una imagen de las bacterias sumergidas en una sustancia homogénea y amorfa, que se pudo conservar durante el examen microscópico.

Conclusiones: La microscopia electrónica de barrido en su modalidad ambiental permite la observación de muestras húmedas en diferentes grados de deshidratación. Por lo tanto, permite al investigador la observación de las biopelículas en su estado natural de hidratación.

Palabras clave: Microscopio electrónico de barrido ambiental. Biopelícula. Amigdalitis.

Environmental Scanning Electron Microscopy for Biofilm Detection in Tonsils

Introduction and objective: To describe an environmental scanning electron microscopic method for the study of biofilms in clinical samples. A comparison with standard scanning electron microscopy is performed.

Patients and method: Nine patients with a past history of recurrent tonsillitis underwent tonsillectomy. Samples from each patient were obtained for both conventional and environmental scanning electron microscopy. The tonsils removed from 2 patients with sleep apnoea syndrome were used as controls.

Results: Eight of nine tonsils had biofilms on their surface. Scanning electron microscopy showed accumulations of bacteria covered by fibrillar structures resulting from the sample dehydration process. Environmental scanning electron microscopy provided a view of bacteria embedded in a homogeneous, amorphous substance that was preserved during the examination.

Conclusions: Environmental scanning electron microscopy permits the imaging of wet systems at different degrees of dehydration. It therefore allows researchers to observe biofilms in their natural hydrated state.

Key words: Environmental scanning electron microscopy. Biofilm. Tonsillitis.

INTRODUCCIÓN

La amigdalitis de repetición es una de las enfermedades más frecuentes en niños y adultos jóvenes. Es frecuente que el tratamiento con los antibióticos apropiados fracase, aun-

que el cultivo microbiológico haya demostrado que la bacteria causal es sensible a dichos fármacos¹. Muchas otras infecciones del organismo muestran una resistencia parecida a los tratamientos convencionales. En los últimos años se ha propuesto una nueva hipótesis para explicar la resistencia de las infecciones bacterianas agudas y crónicas a los tratamientos antibióticos habituales: un patrón especial de crecimiento bacteriano denominado biopelícula. Las biopelículas han sido definidas como "una comunidad estructurada de células bacterianas inmersas en una matriz polimérica fabricada por ellas mismas y adheridas a una superficie inerte o viva"². Chole et al³ han descubierto biopelículas en amígdalas extirpadas de pacientes con amigdalitis de repetición, mediante tinción de Gram y microscopio electrónico de transmisión.

Los autores no manifiestan ningún conflicto de intereses.

Correspondencia: Dra. A. Trinidad.
Servicio de Otorrinolaringología.
Hospital Universitario Puerta de Hierro.
San Martín de Porres, 4. 28035 Madrid. España.
Correo electrónico: atrinidad@yahoo.es

Recibido el 15-7-2007.

Aceptado para su publicación el 20-7-2007.

Se han empleado varias técnicas de imagen en la investigación de las biopelículas. Aunque se considera que el microscopio láser confocal de barrido (CLSM en sus siglas inglesas) es la técnica de referencia, ya que proporciona información tanto morfológica como funcional con una resolución espacial excelente⁴, es muy costosa y está disponible en pocos centros de investigación. Por ello muy a menudo se emplean otras técnicas más asequibles, como la microscopia electrónica de barrido. Sin embargo, esta técnica requiere la deshidratación de la muestra antes del examen, lo que genera importantes distorsiones y artefactos en las imágenes reales en el caso de muestras húmedas biológicas.

El propósito de este trabajo es describir el empleo de microscopio electrónico de barrido en modo ambiental (ESEM en sus siglas inglesas) para el estudio de las biopelículas en muestras de pacientes, ya que permite la conservación de las características biológicas y a la vez una excelente resolución de imagen. Hacemos una comparación con la microscopia electrónica de barrido convencional. Para ello, se han empleado fragmentos de amígdalas extraídas en cirugías habituales.

PACIENTES Y MÉTODO

Se obtuvieron 9 amígdalas de otros tantos pacientes adultos intervenidos de amigdalectomía por amigdalitis de repetición. La media de edad era 29 (19-43) años. Se obtuvieron muestras de control de amígdalas extraídas de pacientes con síndrome de apnea del sueño que no habían padecido amigdalitis al menos en los últimos 10 años (edades, 46 y 51 años). Todos los pacientes dieron su consentimiento al estudio. El proyecto fue revisado y aprobado por el comité ético del hospital.

Después de la extirpación quirúrgica, se seccionaba una de las amígdalas a través de una cripta para obtener dos mitades, y se separaba el tejido correspondiente a las paredes internas de la cripta. Una de las piezas era procesada para microscopia electrónica de barrido convencional, mediante fijación en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón de cacodilato de sodio 0,1 mol/l durante 48 h, y posterior deshidratación en etanol a concentraciones consecutivas del 10, el 30, el 70, el 90 y el 100%. El punto crítico se obtenía con un sistema Emitec 850. Las muestras fueron metalizadas con un sistema Bio-Rad SC-650 y examinadas mediante un microscopio modelo Phillips XL-30 con sistema digital de captación de imágenes.

El otro fragmento de cripta se sumergía en suero salino y se llevaba en fresco al microscopio ambiental, un modelo Philips XL-30 con filamento de tungsteno y equipado con un dispositivo de enfriado Peltier. La muestra se colocaba dentro de la cámara del microscopio ambiental, se fijaba la temperatura a 2 °C y lentamente se generaba una presión de 4 Torr dentro de la cámara, con el fin de controlar el proceso de deshidratación y observar la muestra. Se obtuvieron fotografías a 500 y 1.000 aumentos.

Las microfotografías obtenidas con cada técnica fueron procesadas con el programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, California, Estados Unidos) con el fin de mejorar su contraste.

RESULTADOS

En el microscopio electrónico de barrido convencional, consideramos biopelículas las acumulaciones densas de bacterias. En el microscopio electrónico de barrido ambiental, consideramos biopelículas las acumulaciones de bacterias inmersas en una sustancia amorfa. En comparación, la mucosa normal se veía como una superficie lisa con formas bacterianas aisladas y esporádicas (figs. 1A y B). La matriz amorfa podía variar de espesor dependiendo de la temperatura y la presión dentro de la cámara. Después del examen de la primera muestra, definimos unas condiciones

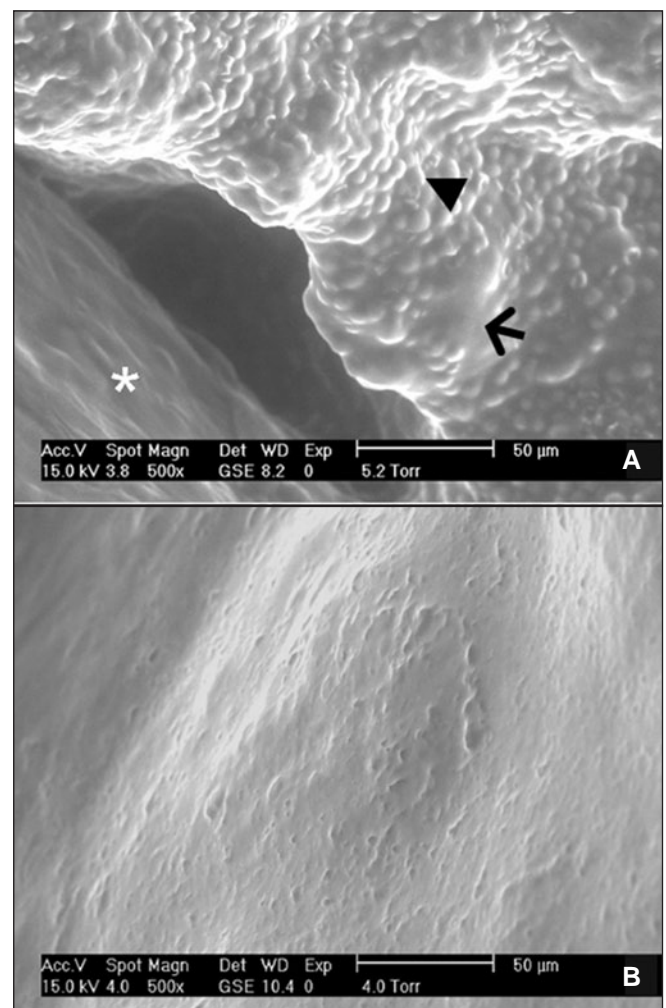


Figura 1. Imágenes de microscopio electrónico de barrido ambiental. A: biopelícula dentro de una cripta amigdalal con un glucocáliz hidratado e intacto en el que las células bacterianas están sumergidas (punta de flecha); se puede observar una zona de mucosa normal en el margen inferior izquierdo de la fotografía (*) ($\times 500$). B: mucosa normal en una muestra extraída de un paciente control ($\times 500$).

óptimas para la visualización de las biopelículas de 2 °C para la temperatura y una presión de unos 4-5 Torr.

De los 9 casos estudiados, se hallaron acumulaciones de bacterias compatibles con biopelículas en 8 casos. El microscopio convencional mostraba las biopelículas como acumulaciones de bacterias con formas esféricas y de bastoncillo recubiertas de estructuras fibrilares que el procedimiento originaba por deshidratación del glucocáliz de mucopolisacáridos (fig. 2B).

La microscopia ambiental mostraba numerosas estructuras celulares esféricas sumergidas en una sustancia amorfa, compatibles con células bacterianas inmersas en una matriz muy hidratada (fig. 1A).

No se identificaron biopelículas con ninguna de las técnicas en las muestras de control (fig. 1B).

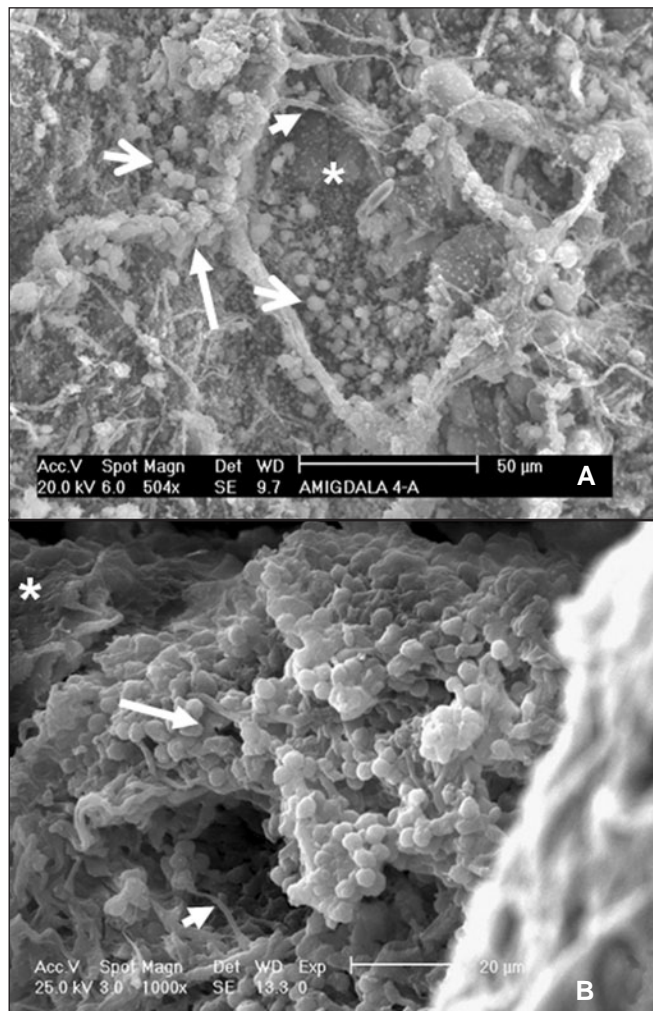


Figura 2. Imágenes de microscopio electrónico de barrido convencional en las que se observa células bacterianas agrupadas y restos del glucocáliz después de la deshidratación de fragmentos de amígdalas. A: pequeñas áreas de la capa mucosa de la cripta, cubiertas de pequeñas estructuras redondeadas que podrían corresponder a artefactos de deshidratación (*); se puede ver acumulaciones bacterianas (flechas abiertas) y residuos fibrilares del glucocáliz (flecha corta) ($\times 504$). B: estructura en forma de torre formada por múltiples capas de bacterias (flecha larga) con remanentes fibrilares diseminados del glucocáliz.

DISCUSIÓN

El concepto de biopelícula surgió en los años setenta con Characklis⁵, que describió la presencia de películas bacterianas en conductos de agua industriales que eran muy resistentes a los métodos de limpieza. Las biopelículas bacterianas son agrupaciones estructuradas de bacterias rodeadas de una matriz polimérica producida por ellas y adheridas a una superficie inerte o biológica². Una vez adheridas, las bacterias segregan polisacáridos que componen una matriz con alto contenido en agua, formando gradualmente grandes colonias. Las bacterias que viven en estas colonias se denominan sésiles. De estas estructuras se pueden desprender células bacterianas aisladas (bacterias planctónicas) o fragmentos de biopelícula que actúan como émbolos sépticos y pueden causar nuevos episodios agudos.

Se considera que la inmensa mayoría de las bacterias en el medio natural crecen en forma de biopelícula, y esto se debe a que esta forma de crecimiento les proporciona un medio de defensa muy eficaz contra los agresores externos. La matriz o glucocáliz que rodea a las células bacterianas retrasa e incluso imposibilita la penetración de los medicamentos antibióticos, los factores de complemento y los macrófagos. Las bacterias sésiles experimentan cambios fisiológicos y alteraciones de la expresión genética que las hacen menos susceptibles a los antibióticos, y un importante porcentaje de ellas están en un estado de crecimiento enlentecido⁶, con menor consumo de oxígeno, y se produce una mayor tasa de intercambio de plásmidos entre las bacterias que componen la biopelícula, que codifican la resistencia a los antibióticos⁷.

Las biopelículas pueden tener un importante papel en muchas infecciones del área otorrinolaringea, de carácter crónico y recidivante y relacionadas con dispositivos implantados: amigdalitis, colesteatoma⁸, sinusitis crónica⁹ e infecciones relacionadas con prótesis endotraqueales y tubos de ventilación¹⁰. Se ha demostrado que varias bacterias que participan en las infecciones otorrinolaringeas son capaces de crecer en forma de biopelícula, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*^{10,11}. Los Centers for Disease Control and Prevention de Estados Unidos estiman que un 65 % de todas las infecciones bacterianas del ser humano se deben a biopelículas¹². El concepto de biopelícula como causa de infecciones recurrentes podría explicar algunos fenómenos desconcertantes como la resistencia in vivo a antibióticos eficaces in vitro, la ausencia de cultivos positivos en pacientes con claros signos de infección bacteriana y la necesidad de extirpar finalmente el foco infeccioso mediante cirugía¹³. Éste puede ser el caso de los pacientes con amigdalitis de repetición que no responden a los tratamientos antibióticos y necesitan finalmente pasar por una amigdalectomía.

En nuestro estudio, se hallaron biopelículas en todos menos uno de los pacientes con amigdalitis de repetición. El hallazgo negativo podría explicarse por el pequeño tamaño de las muestras observadas mediante microscopio.

La microscopia electrónica de barrido ha representado un gran avance en los últimos 40 años. El barrido de la superficie de la muestra con un haz de electrones y la detección de los electrones secundarios o reflejados proporciona resoluciones excelentes de 10 nm e inferiores. Sin embargo, requiere la existencia de un gran vacío y el recubrimiento con metales conductores y no permite el examen de muestras que produzcan vapor de agua cuando estén situadas en la cámara de vacío, ya que esto interfiere con el haz de electrones. Por tanto, las muestras biológicas requieren un largo procedimiento de deshidratación, que es muy destructivo y eleva el riesgo de introducir artefactos y destruir las estructuras más delicadas. El recubrimiento de metal también puede ocultar detalles superficiales finos en las muestras biológicas¹⁴. Algunos autores han comprobado que la capa polisacárida externa y gran parte de la flora bacteriana pueden desaparecer durante el punto crítico¹⁵.

La microscopia electrónica de barrido ambiental es una modificación sustancial de la técnica convencional que permite la visualización de prácticamente cualquier muestra sin previa deshidratación ni baño conductor, porque permite la introducción de una atmósfera gaseosa en la cámara de la muestra (por este motivo se denomina también de "modo húmedo"). A lo largo de la columna se sitúan aberturas que limitan la presión y ayudan a mantener gradaciones de vacío, de modo que hay un vacío óptimo en el haz de electrones mientras en la cámara de muestras se preserva un escaso vacío. El vapor de agua es el gas más frecuentemente empleado en esta técnica, y actúa como un amplificador de la señal de electrones secundarios liberados desde la superficie de la muestra después del primer barrido del haz de electrones. Los iones positivos resultantes de esta amplificación ayudan a compensar la carga negativa generada, por lo cual no es necesario un revestimiento conductor de las muestras con metales. Un detector especial de carácter gaseoso cargado positivamente recoge la señal amplificada de los electrones secundarios. La atmósfera dentro de la cámara de la muestra se estabiliza mediante un dispositivo Peltier de enfriamiento que reduce la temperatura hasta 3-5 °C, de forma que la presión del vapor de agua queda limitada a unos pocos Torr^{14,16}.

Esta técnica en modo húmedo proporciona resoluciones espaciales de 10 nm o menos. Se puede examinar las muestras húmedas, tales como los tejidos biológicos, en su estado original. El hecho de que el procesamiento de la muestra sea mínimo (transporte en recipiente con suero salino) hace que el tiempo invertido en su estudio y los costes económicos sean menores, a la vez que se reduce la posibilidad de introducir artefactos. Como el ambiente de la muestra puede ser alterado dinámicamente, se puede seguir en directo los procesos de hidratación y deshidratación de la muestra. Así, la hidratación proporciona excelentes imágenes de la superficie de la biopelícula, mientras que la deshidratación gradual permite una visión más clara de las células bacterianas a medida que la matriz amorfa pierde agua y se hace más fina.

Sin embargo, a pesar de las numerosas aplicaciones de la microscopia electrónica ambiental a las muestras biológicas, se ha publicado una serie de dificultades en el manejo

de las muestras húmedas. El agua condensada en la muestra puede impedir la visión de detalles muy finos de la estructura, como las microvellosidades. Esto puede ser resuelto mediante una ligera fijación y deshidratación de la muestra para eliminar parte del agua y aumentar la resistencia de las células a las condiciones de la microscopia electrónica ambiental¹⁴. Las diferencias de carga eléctrica en la muestra pueden hacer confusa la topografía. Además, no se puede observar una muestra en fresco durante más de 30 min y sólo se puede realizar un examen. En comparación, la microscopia electrónica de barrido convencional permite múltiples observaciones. Si hay que retrasar el examen de la muestra, se requiere congelarla hasta que pueda hacerse el estudio, en cuyo caso la muestra se descongela lentamente. Esto puede introducir artefactos en la imagen. Las muestras de biopelículas congeladas han mostrado rotura de algunas zonas y la formación de orificios y canales, probablemente debido a una ligera deshidratación y la sublimación del hielo¹⁷. Otro inconveniente de esta técnica es que no se puede realizar mediciones cuantitativas. La menor amplificación posible es 200 aumentos, así que no se puede ver la muestra completa¹⁴. Finalmente, es difícil lograr una resolución óptima, porque la presencia de una película acuosa en la superficie de la muestra limita el análisis topográfico, aunque para algunos autores estas desventajas son ampliamente superadas por la posibilidad de realizar experimentos nuevos dentro de la cámara de muestras¹⁸. En nuestra opinión, la posibilidad de obtener imágenes más realistas de las biopelículas compensa estos inconvenientes.

En conclusión, la microscopia electrónica de barrido ambiental da a los investigadores un método fiable para estudiar detalladamente la estructura de las biopelículas, su presencia en tejidos enfermos obtenidos en quirófano, las relaciones entre la matriz de polisacáridos y las células bacterianas y los cambios producidos en ambos componentes de las biopelículas después de la aplicación de tratamientos locales y generales. Es de esperar una mejora de su tecnología con el fin de obtener los máximos beneficios del estudio microscópico de tejidos biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brook I. Failure of penicillin to eradicate group A beta-hemolytic streptococci tonsillitis: causes and management. *J Otolaryngol*. 2001;30:324-9.
2. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318-22.
3. Chole RA, Faddis BT. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues. A possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129:634-6.
4. Palmer RJ, Sternberg C. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr Op Biotech*. 1999;10:263-8.
5. Characklis W. Attached microbial growths. II. Frictional resistance to microbial slimes. *Water Res*. 1973;7:1249-58.
6. Brown MR, Allison DG, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother*. 1988;22:777-83.
7. Wuertz HM. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:3710-3.
8. Chole RA, Faddis BT. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128:1129-33.
9. Ramadan HH, Sanclement JA, Thomas JG. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132:414-7.
10. Post JC, Stoodley P, Hal-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;12:185-90.

11. Wang EW, Jung JY, Pashia ME, Nason R, Scholnick S, Chole RA. Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains as competent biofilm formers. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2005;131:983-9.
12. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. Science. 1999;283:1837-9.
13. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infection. J Clin Invest. 2003;112:1466-77.
14. Muscariello L, Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Cafiero G, et al. A critical overview of ESEM applications in the biological field. J Cell Physiol. 2005;205:328-34.
15. Richards SR, Turner RJ. A comparative study of techniques for the examination of biofilms by scanning electron microscopy. Water Res. 1984;18:767-73.
16. Danilatos GD. Review and outline of environmental SEM at present. J Microsc. 1991;162:391-402.
17. Sutton NA, Hughes N, Handley PS. A comparison of conventional SEM techniques, low temperature SEM and the electroscan wet scanning electron microscope to study the structure of a biofilms of *Streptococcus crista* CR3. J Appl Bacteriol. 1994;76:448-54.
18. Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. Int End J. 2005;38:775-88.

Application of environmental scanning electron microscopy for study of biofilms in medical devices

A. Trinidad¹, A. Ibáñez¹, D. Gómez², J.R. García-Berrocal¹, and R. Ramírez-Camacho¹

¹ Department of Otorhinolaryngology, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Manuel de Falla 1, 28222, Majadahonda, Madrid, Spain

² Organic Chemistry Institute Lora-Tamayo, Spanish National Research Council (CSIC). C/ Juan de la Cierva 3, 28006, Madrid, Spain

Medical devices have caused a great advance in the diagnosis and treatment of different diseases. However, recurrent infections lead to lack of tolerance and malfunctioning. Bacterial biofilms have been implicated in such infections. The protective layer and distinct metabolic states of bacteria within biofilms provide them with special resistance to biocides and this makes biofilm-related diseases very difficult to treat medically. Until the advent of confocal laser scanning microscopy in recent years, scanning electron microscopy (SEM) was considered the gold standard for morphological study of biofilms and is still of great help. However, this technique requires a gradual dehydration of the specimen prior to examination, which results in sample distortion and artifacts. On the contrary, environmental scanning electron microscopy (ESEM) allows visualization of practically any specimen without prior dehydration or conducting coating and thus the highly hydrated glycocalyx of biofilms can be visualized in its natural state. Biofilms colonizing metallic and polymeric otolaryngologic devices are presented. This technique allows visualization of both biofilm and synthetic material in the same examination.

Keywords biofilms; glycocalyx; environmental scanning electron microscopy; device removal; biocompatible materials

1. Introduction

The widespread use of medical devices has caused a great advance in the management of many diseases. Indwelling (permanent) devices are being increasingly used for the treatment of functional deficits in numerous medical fields. However, when a device remains in contact with human tissues (i.e. implantable device) even for a few hours there is always a risk of infection. Recurrent infections lead to lack of tolerance and malfunctioning. Conventional treatments with antibiotics and steroids are often useless and devices need to be eventually removed. This has important consequences in patient morbidity and a high economic impact.

In the recent years bacterial biofilms have been implicated in a high rate of persistent infections in relation to implanted devices in all medical fields. The substantial advantages that prostheses and implants provide presume a major use of these devices during next years. This fact, together with high life expectancy will probably increase infection-related problems. Therefore, it is important to determine the influence of biofilms in device failure and how to prevent its formation. Previous to this outburst of interest in the medical community, biofilms were well known in the industrial field. This problem affects mainly to industrial water-based process, including water treatment and distribution, pulp and paper manufacturing and others. Biofilms cause pipe plugging and corrosion and are responsible for causing important economic losses by damaging equipment and contamination of water and other fluids. Removal of damaged material is a solution in both industrial and medical fields. However, chemical treatments may greatly differ and a specific research must be done in this area.

The importance of biofilms is however not limited to implants-related infections. Biofilms are also implicated in persistent infections in chronically ill patients and even in otherwise healthy people. As an example, dental plaque is composed of biofilms that are resistant to antiseptic rinsing solutions and can be removed only mechanically. Dental plaque can lead to serious gum infections and other complications if inadequately treated. In the case of chronically ill patients, it is believed that modern medical advances allow survival of this kind of patient but a depressed immune system and invasive diagnostic tests and treatments may predispose to colonization by biofilms and recurrent bouts of acute infection caused by them.

2. What is a biofilm

2.1 Definition

A bacterial biofilm is a structured, heterogeneous community of bacterial cells enclosed in a protective self-produced polymeric matrix (also called glycocalyx) that are irreversibly attached to an inert or living surface or to each other, and exhibit an altered phenotype with respect to growth rate and gene transcription. Biofilms are ubiquitous in nature [1] and are present in fossil evidence [2], indicating that biofilm formation is an excellent survival strategy for bacteria. The

general theory of biofilm predominance states that the majority of bacteria grow in matrix-enclosed biofilms adherent to surfaces in all nutrient-sufficient aquatic ecosystems and that these sessile bacterial cells differ greatly from their planktonic counterparts [3]. The reason for this ubiquity is that the protective layer and distinct metabolic states of bacteria within biofilms provide them with special resistance to host defences and antimicrobials, including natural antibiotics.

Humans have suffered from acute bacterial infections in which planktonic cells of specialized pathogens caused life-threatening conditions. Revolutionary findings such as antibiotics and vaccines have helped us beating these acute diseases. Unfortunately, organisms that were not traditionally pathogenic are employing the biofilm strategy to mount successful attacks on human bodies and compromised individuals are especially susceptible. Advances in direct examination of biofilms have increased our knowledge of biofilms implicated in chronic and device-related infections. Much of the early investigations relied on the transmission and scanning electron microscope. Lately, confocal laser scanning microscopy produced a new type of images that complemented the knowledge about biofilm ultrastructure, cellular viability and biofilm development.

2. 2 Estructure

The basic structural unit of the biofilms is the microcolony. A mature biofilm is composed of cells (10-15 % by volume) and of glycocalyx (85-90 % by volume). The cells embedded in glycocalyx form gross structures resembling towers and mushrooms, sometimes as high as a few millimeters. Open channels are interspersed between the microcolonies resembling a primitive circulatory system. Water and nutrients enter these channels and contribute to nutrition and formation of mature biofilms. Waste products are also removed through this system.

The cells composing a biofilm can be of single species or more commonly are heterogeneous species of bacteria and fungi. In the latter case the metabolic by-products of one organism might serve to support the growth of another, and the adhesion of one species might provide ligands allowing the attachment of others. A mature biofilms contains thousands of bacteria [4].

The glycocalyx is mainly composed by bacterial exopolysaccharides. Other components are nucleic acids, minerals and proteins. When fully hydrated, the glycocalyx is predominantly water, with an anionic charge that creates a scavenging system for trapping and concentrating essential nutrients from the environment. Glycocalyx also provides a protective layer against biocides (see below) and this is the most prominent morphologic feature addressed in this chapter.

2. 3 Development

The process of bacterial adhesion and biofilm formation may vary depending on the species, the surface composition and environmental factors, but is similar in all species except for the differences dictated by gene expression. Primary adhesion between bacteria and abiotic surfaces is generally mediated by nonspecific interactions. Adhesion to biological tissues is activated and accomplished through specific molecular mechanisms.

2.3.1. Surface conditioning: Some authors include a primary step, the surface conditioning, which is a consequence of the interaction between the surface and the environment [5]. In the case of synthetic prostheses, conditioning occurs when the devices is placed in contact with human tissues (e.g. a nasolacrimal stent). The native surface is then modified by adsorption of water, albumin, complement, fibronectin, lipids, extracellular molecules, etc. This process, usually necessary for the adequate integration of the devices in the tissues, can alter the surface in a way that also promotes the affinity of microorganisms.

2.3.2. Adhesion: In a first reversible stage, planktonic bacteria meet a conditioned surface and several variables take place. The microorganism may be brought into close proximity randomly or in a directed way via chemotaxis and motility. Once the organism reaches a critical proximity to a surface, usually <1 nm, the final adhesion is determined by the sum of attractive and repulsive forces (electrostatic and hydrophobic interactions, van der Waals forces, hydrodynamic forces, etc) and specific molecular interactions (adhesins). In a second stage, the organism anchors to the surface by means of molecular bindings. Planktonic microorganisms can also stick to others of the same or different species. In fact, the presence of one species on a surface can promote the adhesion of others. Organisms can consolidate the adhesion by producing exopolysaccharides that attach to surface materials.

2.3.3. Maturation: Surface-bound organisms begin to actively replicate and excrete exopolysaccharides that interact with the environment to create the glycocalyx. In the case of infected biomedical implants it might include host-derived inflammatory proteins, complete, fibrinogen and glycosaminoglycans. The biofilm growth is defined by the nutrients availability. Once fully matured, altered patterns of bacterial growth and metabolic activity are generated and the biofilm transforms into a form of physiological communal cooperation that mimics primitive eukaryotic tissue [6]. Such phenotypic changes are mediated by changes in genotypic expression and quorum sensing mechanisms.

2.3.4. Detachment: At some point the biofilm reaches a critical mass and the outermost layer begins to generate planktonic organisms that may escape from the biofilm and colonize other surfaces. Dispersion of planktonic cells can be facilitated by digestion of glycocalyx by enzymes and quorum-sensing signals might be required for this

phenomenon [7]. Other mechanism of dispersion may be mechanical shearing forces that cause the detachment of biofilm fragments. These fragments may act as septic emboli and colonize distant sites within the organism.

2. 4 Defence mechanisms

Its structure and particular physiology confers the biofilm an inherent resistance to biocides. In fact, they can become 10–1000 times more resistant to the effects of antimicrobial agents. Several mechanisms are involved:

2.4.1. Delayed penetration: The extracellular polymeric substances constituting the glycocalyx present a diffusional barrier for antimicrobial molecules. They retard the diffusion of antibiotics and solutes in general [8]. Some antimicrobial oxidants such as hypochlorite and hydrogen peroxide, which are products of the oxidative burst of phagocytic cells, are deactivated in the outer layers of the biofilms faster than they diffuse [1].

2.4.2. Altered growth rate of biofilm organisms: bacterial cells within biofilms grow significantly more slowly than their planktonic counterparts. Thus, the uptake of antimicrobial agents is much slower. Slow-growing or starved states may be conditioned by nutrient limitation or by a general stress response. Heterogeneity of metabolic states makes it possible for at least some of the cells to survive to any metabolically directed attack.

2.4.3. Specific biofilm phenotype: At least some of the cells within a biofilm adopt a distinct and protected biofilm phenotype. This could be a biologically programmed response to growth on a surface, with repression or induction of genes [9].

3. High-resolution microscopic techniques for the study of biofilms

3.1 Introduction

Though light and fluorescence microscopy allow the visualization of biofilms, higher resolution techniques are required for detailed study of the structure of cells and glycocalyx. Electron microscopic techniques offer detailed insight into the ultrastructure of biofilms and provide the researchers with different types of data depending on the technical characteristics of each method.

Scanning electron microscopy (SEM) allows visualization of surface structures with a three-dimensional appearance and at different resolutions. However, it requires the proper conditioning of the sample due to the high vacuum and conductive properties required. Thus, fixation, dehydration and conductive coating of the sample are necessary and biological samples may undergo distortion and artifacts. In the case of biofilms, the highly hydrated glycocalyx is greatly distorted and only proteinaceous structures can be visualized. Gold-immunolabelling techniques allow quantification of certain proteins [10].

Transmission electron microscopy (TEM) is the standard electron microscopic technique used for the evaluation of ultrathin sections. It requires dehydration and embedding in acrylic resin, as well as staining with heavy elements for the purpose of contrasting. In spite of this complex processing, TEM is still considered a gold standard in electron microscopy due to its high resolution of down to 0.1.

Cryo-electron microscopy allows the evaluation of ultrathin sections of biological samples in a hydrated state. The formation of vitreous (non-crystalline) ice preserves the appearance of the sample. However, this technique requires a complex processing of samples and specialized equipment [11].

Confocal scanning laser microscopy (CSLM) is an epifluorescence microscope that creates a thin plane-of-focus. Laser light is scanned across the specimen to provide excitation energy for intrinsic or extrinsic fluorophores, with subsequent detection of the resulting fluorescence. It allows study of biofilm morphology and physiology under in situ conditions and has become a gold standard method for the characterization of cells within biofilms and metabolic and gene activity. However, much of these studies require a complex processing of the sample and even a degree of dehydration and therefore a risk of distortion. CSLM images of implants can be difficult to interpret because they are often acquired at low resolution to maximize the viewable area of the implant [12].

3.2 Environmental scanning electron microscopy (ESEM)

Environmental scanning electron microscopy (ESEM) is a descendant of the conventional SEM that overcomes a clear disadvantage of this technique in the biological field: the need for altering the characteristic of biological samples to visualize them in the high-vacuum chamber. Biological samples are highly hydrated and exhibit low conductivity. In a conventional SEM, the water contained in such samples quickly evaporates with the consequent collapse and distortion of the sample. At the same time, the vapour decreases the vacuum and contaminates the detectors and column. Also the low conductivity of the sample causes its electrical charging and interferes with the electron beam and the secondary electron emission. Therefore, biological samples need to undergo a complex processing before visualization with SEM. This processing involves fixation, dehydration, critical-point drying and conductive coating and may result in distortion of size and shape of the sample and in artifacts. Microscopes designed with a dual purpose (ESEM/SEM) are currently available.

The ESEM incorporates two design modifications that allow visualization of poorly conductive biological samples in their natural hydrated state. [13]

3.2.1 Gaseous detection device for secondary electron detection

The ESEM is based upon the gaseous detection device (GDD). The main feature distinguishing ESEM from conventional SEM is the presence of a gas in the specimen chamber. Gases may include nitrous oxide, helium, argon and other, but water vapour is the most efficient amplifying gas found and the most common gas used in ESEM. The ionization GDD uses the ionization of the gas for the detection of secondary electrons from the specimen surface. It is a conical electrode about 1 cm in diameter that is positioned with the apex downward and concentric with the beam at the bottom of the pole piece. Secondary electrons emitted from the sample collide with water molecules in the chamber producing additional electrons and positive ions. The positive ions are attracted to the sample surface and eliminate the charging artifacts. A proportional cascade amplification of the original secondary electron signal results. With the GDD both secondary and backscattered electron images can be produced. Detailed technical explanations about this device can be found elsewhere [14].

3.2.2 Multiple pressure-limiting apertures

The multiple apertures are situated below the objective lens and separate the sample chamber from the column. This feature allows the column to remain at high vacuum while the specimen chamber may sustain pressures as high as 50 Torr. The temperature and humidity of the sample can also be manually controlled to provide a suitable environment for maintaining the biological samples in their natural state.

3.2.3 Advantages of ESEM in the study of biofilms: the glycocalyx

ESEM allows visualization of the highly hydrated glycocalyx that covers and protects the bacteria. As conventional antibiotics seem useless or need very high doses for the eradication of biofilms, alternative treatments must be found that allow disruption of the protective glycocalyx. Thus, studies on glycocalyx-targeted drugs can benefit of a technique that allows excellent visualization of this structure.

Additional advantages of ESEM include minimal processing of samples which is of high importance when working together with clinical researchers that obtain samples from human patients. It results in shorter time scales and lower costs while reducing the possibility of introducing artefacts. Samples can be preserved in saline in a common refrigerator (in fresh) if examination is to be deferred a few hours [15]. ESEM provides spatial resolutions of 10 nm or less.

In general, a combination of several techniques is to be recommended when investigating biofilms as the different techniques offer distinctly valuable information about different aspects: the topography and structure of the glycocalyx (ESEM), living and death bacteria within the biofilm (CLSM), and rough structure of the dehydrated glycocalyx and the bacteria within (SEM, light microscopy).

4. Biofilm formation on implants

It is well known that bacterial colonization of medical implants can lead to persistent infection of the site of implantation. The immune system and the antibiotics may not be able to fully eradicate these infections because, as we stated above, the responsible microorganisms are well protected by the encasing glycocalyx. Inflammatory response can eventually damage surrounding tissues without destroying the biofilm. In such cases, removal of the implant is the only solution.

ESEM provided us with the possibility of imaging biomaterial samples together with the surface changes experimented during the implantation time. Thus, irregularities of surface can be visualized and it is possible to determine if biofilm colonization is more predominant in irregular areas of the surfaces. Changes in biofilm density as a function of the material topography can be determined.

When first studying our samples with the ESEM, optimal pressure inside the chamber was determined between 3.4 and 3.6 Torr. Under this pressure the glycocalyx remains conveniently hydrated while the bacterial cells become visible and the image is stable (no charging on the sample occurs that could result in continuous position change). The specimen was placed into the ESEM chamber, temperature was fixed at 2°C and pressure inside the chamber was modified slowly from 6.0 to 3.4 Torr to control the dehydration process and observe the sample (the less pressure inside the chamber, the higher amount of water molecules able to evaporate and fill the chamber).

Figure 1 shows an example of biofilm seen under conventional SEM. The glycocalyx structure has been greatly distorted by the dehydrating process and only bacterial cells are clearly seen. When comparing this image with figures 2 and 3 (similar magnification) the difference with a well hydrated glycocalyx is noticeable.

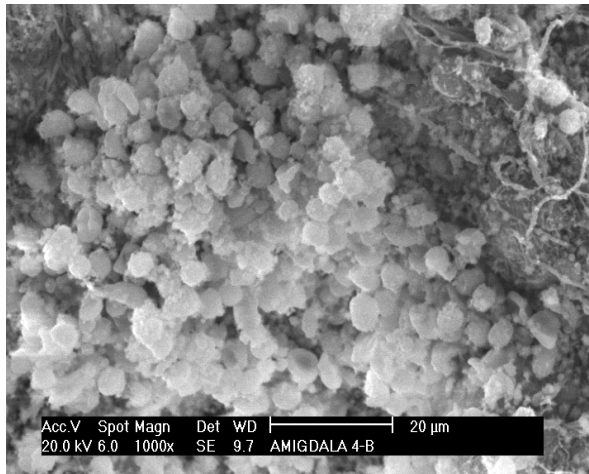
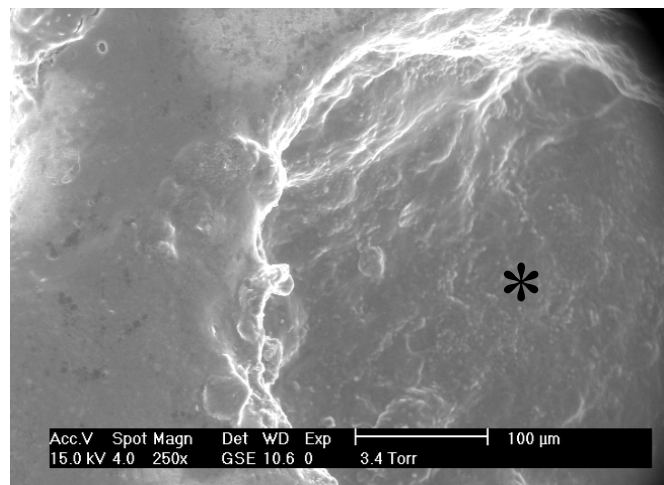


Fig. 1 Tonsil removed from a patient with chronic tonsillitis. Clusters of bacterial cells can be seen on the surface with some fibrillar and granular structures that could correspond to proteinaceous components of the glycocalyx or to some type of debris. No hydrated glycocalyx can be seen in the image (1000x magnification).

Fig. 2 Titanium ventilation tube removed 3 months after implantation in a child. The patient had repeated foul-smelling otorrhea episodes that did not respond to treatments with topical antibiotics. The inner lumen surface is blocked and covered with biofilms (*) (250x magnification).



Next examples correspond to otolaryngologic devices removed from patients. Ventilation tubes are commonly employed for recurrent ear infections and recurrent collections of fluid within the middle ear causing hearing loss. They are made of different biomaterials (titanium and polymers) and are placed in the tympanic membrane through a small incision. The tube helps balance the pressure in the environment with that in the middle ear. An estimated variable incidence of postoperative infection between 15 and 19% is reported [16]. Images shown here (figures 2 and 3) correspond to titanium tubes (Gyrus ENT LLCR). Figure 1 shows images from a ventilating tube removed from the ear of a patient who suffered from recurrent otorrhea after surgery. The tube was removed 3 months after implantation.

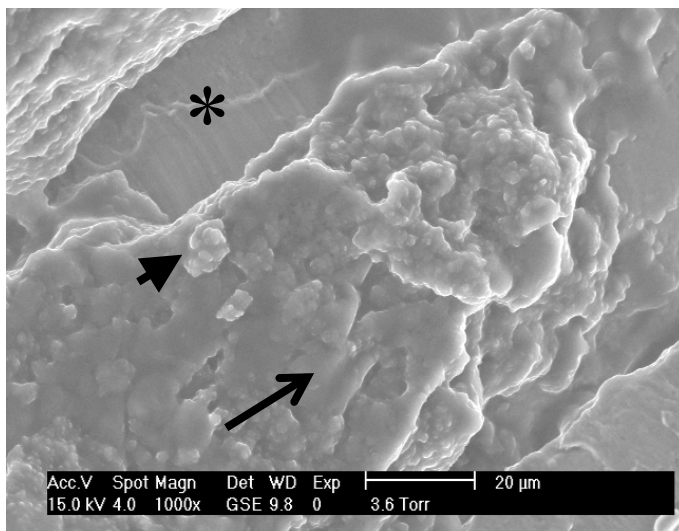


Fig. 3 This micrograph shows a biofilm fragment colonizing a titanium ventilating tube. The three-dimensional structure of the biofilm can be seen with some prominent cells (arrow head) and the smooth glycocalyx layer (long arrows). Note the presence of irregularities on the uncovered surface of the device (*). Irregular, non-smooth surfaces are believed to be more prone to colonization by adherent bacteria.

Figure 4 shows a titanium total ossicular replacement prosthesis (TORP, Kurz Medical, Inc.R) removed from the middle ear of patient 1 year after implantation. TORPs are usually employed for reconstruction of the ossicular chain that has been damaged by recurrent infections of the middle ear. In these cases, TORP may be eventually extruded through the tympanic membrane due to uncompletely understood reasons. Nevertheless, titanium TORPs show low extrusion rates, contrarily to former TORPs made of polymers like Plastipore [17]

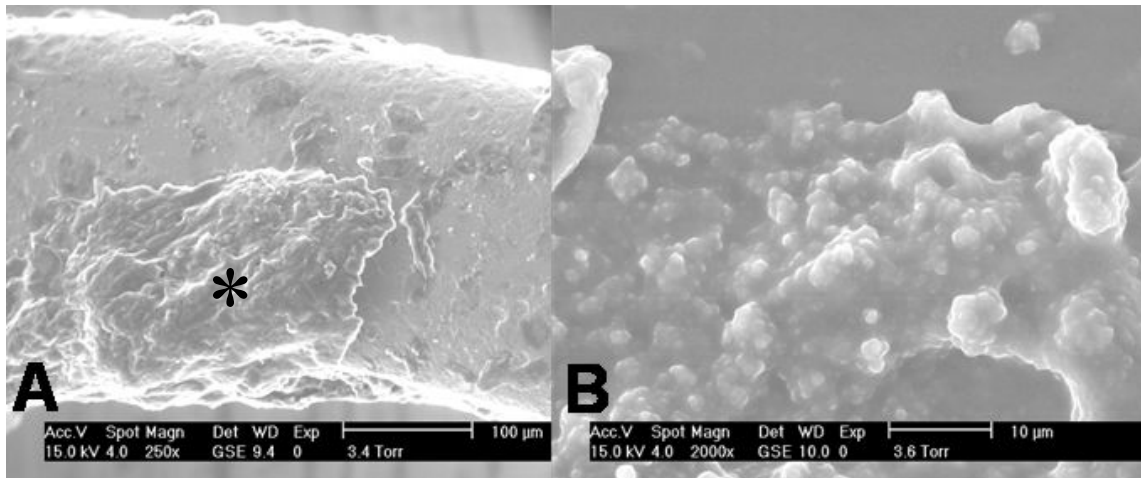


Fig. 4 Micrographs showing images of a titanium total replacement ossicular prosthesis at different magnifications. A shows the ability of ESEM to first perform a preliminary scanning of the sample with low magnification (250x) yielding a panoramic view of the biomaterial and colonized areas on its surface (*). The most interesting areas can then be magnified to obtain a higher resolution image. B shows the biofilm structure in detail with the bacterial cells embedded in an aqueous material that is identified as the glycocalyx (2000x magnification).

Nasolacrimal stents made of polyurethane have been used in cases of obstruction of the lacrimal system. They seemed promising as implantation was done without general anesthesia and was more economic than traditional surgical treatments. However, long-term evaluations have shown a progressive increase in failures and many stents need to be eventually removed [18]. Causes are not clear, but we were able to find abundant biofilms in the stents removed in our patients because of failure of the prosthesis and persistence of symptoms (tearing).

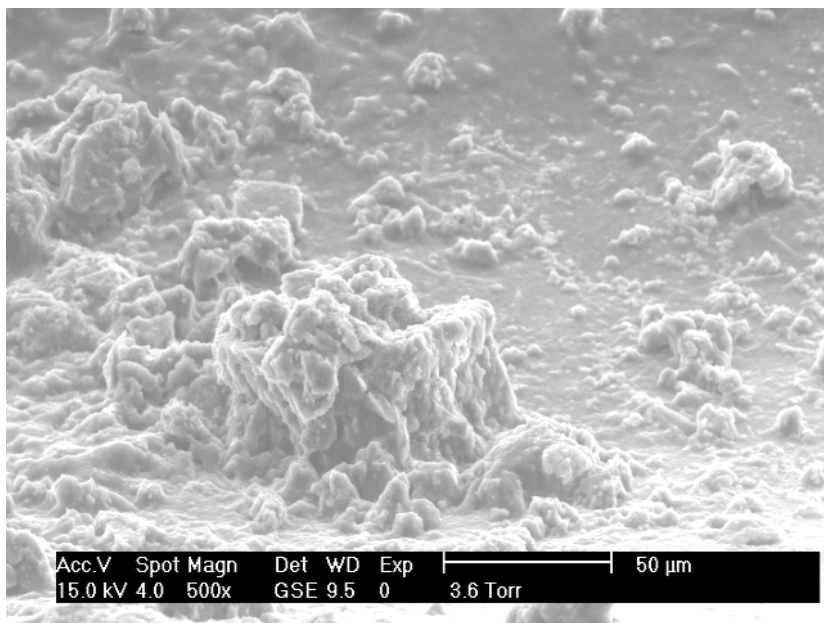


Fig. 5 Biofilms on a polyurethane nasolacrimal prosthesis removed 1 year after implantation (500x magnification).

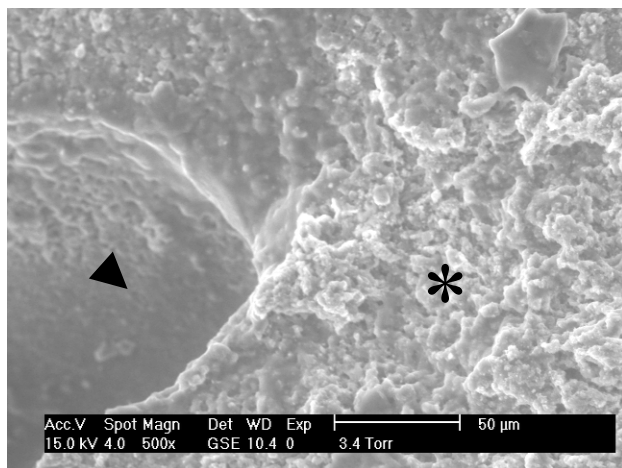


Fig. 6 Biofilms on a polyurethane nasolacrimal prosthesis removed 17 months after implantation. Extensive colonization can be observed in the internal lumen of the stent (arrowhead) and in the outer surface (*) (500x magnification).

5. Conclusion

ESEM is a high-resolution microscope technique highly advisable for topographical evaluation of medical biomaterials and detection of biofilms. This technique provides excellent visualization of the glycocalyx, which is one of the most prominent features of biofilms and a crucial research subject in the searching for alternative antimicrobial treatments. ESEM in association with the confocal laser scanning microscopy allow a complete study of the biology of biofilms.

References

- [1] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;21:318-322
- [2] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the environment to infectious disease. *Am J Rhinol* 2005;19(1):1-6.
- [3] Costerton JW, Geesey GG, Cheng GK. How bacteria stick. *Sci Am* 1978;238:86-95
- [4] Dunne WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002;15:155-166
- [5] Gristina AG. Biomaterial-centered infection, microbial vs tissue integration. *Science* 1987;237:1588-1597
- [6] Costerton JW, Lapping-Scott HM. Introduction to microbial biofilms. In H. M. Lapping-Scott and J. W. Costerton (ed). *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, New York, N. Y. 1995.
- [7] Puskas A, Greenberg EP, Kaplan A, Schaefer AL. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* *J Bacteriol* 1997;179:7530-7537.
- [8] Mah TF, O'Toole GA. Mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001;9(1):34-39.
- [9] Dagostino L, Goodman AE, Marshall KC. Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces. *Biofouling* 1991;4:113-119.
- [10] Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deimling D, Huber K, Hoth-Hannig W, Bowen WH, Hannig M. Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. *Arch Oral Biol* 2008;53:1003-1010.
- [11] Bouchet-Marquis C, Fakan S. Cryoelectron microscopy of vitreous sections: a step further towards the native state. *Methods Mol Biol* 2009;464:425-439.
- [12] Gorman S, Adair C, Mwhinney W. Incidence and nature of peritoneal catheter biofilm determined by electron and confocal laser scanning microscopy. *Epidemiol Infect* 1994;112:551-559.
- [13] Danilatos GD. Introduction to the ESEM instrument. *Microsc Res Tech* 1993;25:354-361.
- [14] Danilatos GD. Theory of the gaseous detector device in the environmental scanning electron microscope. *Advances in Electronics and Electron Physics* 1990;78:1-102.
- [15] Ramírez-Camacho R, González-Tallón AI, Gómez D, Trinidad A, Ibáñez A, García-Berrocal JR, Verdaguer JM, González-García JA, San Román J. [Environmental scanning electron microscopy for biofilm detection in tonsils] *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2008;59(1):16-20.
- [16] Hochman J, Blakley B, Abdoh A, et al. Post-tympanostomy tube otorrhea: a metaanalysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;135:8-11.
- [17] Pinilla M, Ramírez-Camacho R, Arellano B, González FM, García Berrocal JR, Jorge E. [Synthetic implants in the reconstruction of the ossicular chain]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 1996 ;47(5):359-62.
- [18] Ibáñez A, Trinidad A, García-Berrocal JR, Gómez D, San Román J, Ramírez-Camacho R. Biofilms colonization in nasolacrimal stents. *B-ENT* (in press).

Biofilm colonisation in nasolacrimal stents

A. Ibáñez¹, A. Trinidad¹, J. R. García-Berrocal¹, D. Gómez², J. San Román² and R. Ramírez-Camacho¹

¹Department of Otorhinolaryngology, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, Spain; ²Organic Chemistry Institute Lora-Tamayo, Spanish National Research Council (CSIC), Madrid, Spain

Key-words. Biofilms; lacrimal duct obstruction; epiphora; dacryocystitis; environmental scanning electron microscopy

Abstract. *Biofilm colonisation in nasolacrimal stents. Problem/Objective:* Nasolacrimal duct obstruction is a common problem. A Song stent is a useful and simple treatment with low morbidity. However, the success rate is limited, especially in long-term follow-up. The aim of the present study is to determine the presence of biofilms in failing nasolacrimal stents.

Methodology: Thirty-three polyurethane nasolacrimal stents were implanted between January 2006 and December 2007 using Song's technique. Patients were followed for a mean of 21.5 months (range 11-30 months). Removed nasolacrimal stents were preserved in saline and examined using environmental scanning electron microscopy (ESEM).

Results: Eighteen nasolacrimal stents were removed because of the failure of the device (follow-up range 11-30 months). Seven stents were recovered for this study. Biofilms were identified in all the specimens studied. Five prostheses showed occlusion caused by mucus or granulation tissue.

Conclusions: Biofilm colonisation of nasolacrimal stents could play a major role in prosthetic failure leading to stent occlusion. Mucus, granulation tissue and irregularities of the biomaterial are factors that facilitate biofilm colonisation. Non-stick material for newly developed stents or drugs capable of destroying the polysaccharide matrix should be considered as future therapeutic options.

Introduction

The first surgical treatment for lacrimal sac and duct obstruction with permeable canaliculi was external dacryocystorhinostomy (DCR), with fistulisation of the lacrimal sac into the nasal cavity. Endonasal dacryocystorhinostomy (DCR) was developed shortly after as a technique for avoiding cutaneous scarring (which is highly important when there is a high risk of hypertrophic scar) and the disruption of medial canthus anatomy. The technique resurged with the advent of endoscopic nasal surgery. Endoscopic technique had a high success rate, with less intra-operative and post-operative bleeding, but it still required a prolonged operative time and considerable expertise.¹ In this context, the introduction of a non-surgical treatment for nasolacrimal obstruction by Song

et al. was promising.² Song stents are positioned by radiologists, they require no general anaesthesia and the advantages include the absence of cutaneous scarring, a minor risk of bleeding and the outpatient setting. Some authors have even reported on the possibility of placing these stents without the assistance of fluoroscopic guidance.³

However, the usefulness of the Song stent is limited by its moderate long-term success rate. Lumen obstruction is common and the success rate for stent implantation is rather variable. Most authors report complete resolution of symptoms in less than 50% of cases after 4 years of follow-up.⁴⁻⁸ By contrast, external and endoscopic non-laser DCR showed higher success rates in a recent systematic review.⁹

The aim of the present study is to use ESEM to evaluate the

development of biofilms in nasolacrimal stents removed from patients after prosthesis failure. ESEM is a technique that allows the ultrastructural study of biological samples without dehydration.

Materials and methods

Thirty-three polyurethane Nasolacrimal Duct Stents (COOK[®], Queensland, Australia) were implanted in 27 Caucasian patients between January 2006 and December 2007. All procedures took place in the Radiology Unit on an outpatient basis. Mild sedation and local anaesthesia of the conjunctival and nasal mucosa were administered in all cases. The stents were implanted using Song's technique by introducing a guide wire through the superior or inferior punctum into the canaliculus and advancing it across the obstruction

into the opening of the inferior meatus of the nasal cavity.² Oral prophylactic amoxycillin was given 24 hours before the procedure and for 7 days afterwards, along with a topical antibiotic and steroid eye drops. In 18 cases, the symptoms were found to persist and patients were referred to the Department of Otorhinolaryngology for the removal of the prosthesis and endoscopic DCR.

Seven prostheses were randomly sampled for study. Once the patient was anaesthetised, the nasolacrimal stent was located and removed from the lacrimal duct through its natural opening in the inferior meatus. The stent was preserved in saline and sent in fresh for visualisation using ESEM. In two cases, a small fragment from the superior end was cut and sent in saline for culture. A Philips XL-30 ESEM with tungsten filament and equipped with a Peltier cooling stage was used. The specimen was cut into small pieces of approximately 5 × 5 mm and placed in the ESEM chamber, the temperature was fixed at 2°C and pressure inside the chamber was modified slowly from 6.0 to 4.0 Torr to control the dehydration process and observe the sample. Photographs were taken at ×250, ×500, ×1000 and ×2000 magnifications and images were contrast-enhanced for publication with Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc, San Jose, Calif, U.S.).

Informed consent was obtained from all patients. This study was approved by the Ethics Committee of our Centre.

Results

A total of 33 polyurethane stents were implanted in 27 patients

(12 male, 15 female), mean age 63.9 (range 82-40). No major complications occurred in any patient. Follow-up ranged from 11 months to 30 months (mean follow-up 21.5 months).

Eighteen nasolacrimal stents were removed because of the failure of the device (54.5% of implanted prostheses). Mean time to stent failure was 6.5 months (15 days-24 months). Ten patients underwent a surgical procedure as a second treatment, six through an external approach and four through an endoscopic DCR. The other patients rejected any kind of intervention.

Biofilms were found in all the samples studied, predominantly on the irregular inner surface (Figure 1B), in obstructed areas (Figures 1A,1C), and at the nasal and lacrimal ends (Figure 1D). Five stents showed occlusion caused by mucus secretion or granulation tissue macroscopically.

Cultures yielded *Staphylococcus aureus* in one patient and *Stenotrophomonas maltophilia* in the other case.

Discussion

Although traditionally employed in industry, ESEM soon became a diagnostic method in human microbiological diseases. It represents an important extension of conventional electron microscopy. ESEM provides a technology for imaging hydrated or dehydrated biological samples with minimal manipulation and without the need for conductive coatings.^{10,11}

External and endoscopic DCR and their surgical variants have been reported as effective techniques for the treatment of epiphora, with stable results

over time. External DCR has traditionally been the gold standard. However, endoscopic DCR is a valid alternative for distal lacrimal system obstruction,¹² with shorter operating times and fewer cosmetic sequelae. By contrast, the learning curve is longer than for the external approach.¹³ Both procedures need an experienced surgeon and general anaesthesia. On the other hand, non-surgical methods have also been developed for the relief of epiphora. Quickert and Dryden developed a new method of nasolacrimal intubation in 1969.¹⁴ Since then, different materials have been used to achieve the best results (silicone, metal and polymers). The Song stent has been one of the most popular methods and its creator reported an initial success rate of 90%.¹⁵ However, other authors have reported varied success rates with the use of the Song stent, ranging from 31.2%⁵ to 68.4%⁶ at 18-24 months of follow-up. Failure rates increase considerably over time, reaching 86.5% at 4 years in some series.⁴ Song himself reported poorer results than previously expected.¹⁶ These poor results and success rates of 85% for endonasal DCR (slightly better for the external approach) make these two procedures the definitive solution in most cases.

Stent obstruction is a possibility, despite saline solution irrigations and topical and systemic antibiotics. Several studies have suggested mucus, granulation tissue, fibrosis or necrotic material collection within the lumen as a possible cause of device occlusion.^{7,8,16} Nevertheless, the development of biofilms is a proven cause of device failure in otorhinolaryngology and other specialities. A biofilm is a

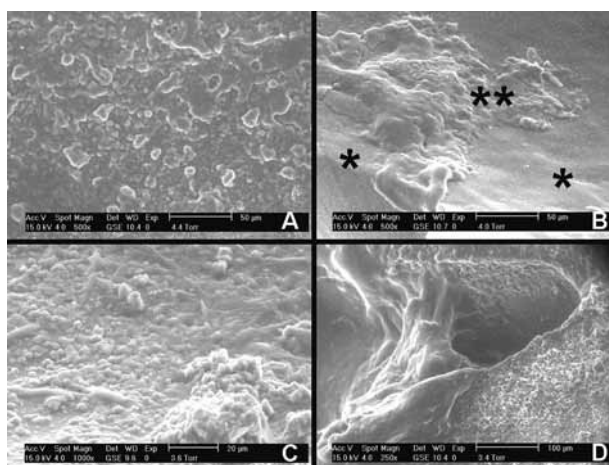


Figure 1

Nasolacrimal stent images from environmental scanning microscopy in four different patients. Note the magnifications and chamber pressure in the black bar of each micrograph.

A: Biofilms covering obstructing plug in stent lumen (500× magnification); B: Micrograph showing stent irregularities (*) next to biofilm colonies (**). Normal stent architecture is visible in some parts (500× magnification); C: Biofilms over an obstructed area of a nasolacrimal stent (1000× magnification); D: Micrograph showing microcolonies over the nasal end of a nasolacrimal stent (250× magnification).

complex organisation of bacteria attached to a surface that live together in organised structures and communicate with one another in a co-operative manner.¹⁷ The bacteria are embedded in a polysaccharide matrix. This structure provides advantages such as protection from environmental changes, resistance to host defence mechanisms and resistance to antibiotics. Bacterial biofilms have been increasingly recognised as playing an important role in chronic human infections. Dental plaque, cystic fibrosis, chronic prostatitis, otitis media and recurrent tonsillitis are only a few examples.¹¹

External prostheses provide surfaces for the rapid formation of biofilms. Urinary catheters, venous and arterial catheters, vocal prostheses, endotracheal and ventilation tubes, among others, have therefore been

described as being susceptible to biofilms.¹⁸ It suggests that open cavities with commensal pathogens are ideal locations for biofilm growth, especially if an external prosthesis is placed inside, which is the case with nasolacrimal stents. All these factors account for the ubiquitous presence of biofilms in the nasolacrimal stents removed for study.

The presence of mucus or granulation tissue in prosthesis lumens and irregularities (Figures 1A,1B,1C) in the surface of prostheses predispose to the development of bacterial and fungal colonies. Conversely, biofilms could influence the inflammatory process, leading to eventual stent obstruction.

There is controversy about what kind of material would be more appropriate for preventing biofilm colonisation and whether

modifications to materials (i.e. silver coating) are protective or not. In our experience, grooves and other irregularities seem to be points of easy adherence and subsequent colonisation. Moreover, some authors have found surface changes and degradation in polyurethane devices exposed to organic environments for three months.¹⁹ It is remarkable that we found *Stenotrophomonas maltophilia* (formerly classified in the genus *Pseudomonas*), a low-virulence pathogen that frequently colonises the respiratory tract in patients with cystic fibrosis, even though the patient in whom this bacteria was found had no risk factors.²⁰ *S. maltophilia* can also colonise irrigation solutions and the hands of medical personnel, and this could be the origin of this colonisation in our patient.²¹

The limitation of this study is that the causative relationship between biofilm colonisation and stent failure was difficult to establish. Biofilms were identified in all the stents studied but ethical grounds precluded the studying of patients with functioning lacrimal stents. However, the presence of biofilms in failing prostheses is well documented in both otolaryngology and other medical fields. Since infection is a major cause of prosthesis failure, it is reasonable to see biofilms as an important influencing factor and a major research target in the field of biomaterials and medical devices.

Conclusion

Although nasolacrimal intubation is a simple and fast procedure, the high rate of restenosis has reduced its usefulness in the management of lacrimal duct obstruction. The development of new, improved

materials and designs in the manufacturing of nasolacrimal stents might benefit patients. Designing materials with non-stick properties and/or drugs capable of destroying the polysaccharide matrix of biofilms could result in lower failure rates for lacrimal stents and other otolaryngological devices, enhancing patient safety and lowering costs. At present, dacryocystorhinostomy shows better results, making it the technique of choice for the treatment of distal nasolacrimal obstruction. The endonasal approach results in less morbidity than the external approach and must be offered to patients with nasolacrimal disease.

References

1. Watkins LM, Janfaza P, Rubin PA. The evolution of endonasal dacryocystorhinostomy. *Surv Ophthalmol*. 2003;48(1):73-84.
2. Song HY, Ahn HS, Park CK, Kwon SH, Kim CS, Choi KC. Complete obstruction of the nasolacrimal system. Part II. Treatment with expandable metallic stents. *Radiology*. 1993;186(2):372-376.
3. Lee JS, Jung G, Oum BS, Lee SH, Roh HJ. Clinical efficacy of the polyurethane stent without fluoroscopic guidance in the treatment of nasolacrimal duct obstruction. *Ophthalmology*. 2000;107(9):1666-1670.
4. Falappa P, Ortenzi M, Passarelli F, Micozzi M. Dacryocystostenting: technical and long-term results. *Radiol Med*. 2006;111(1):116-122.
5. Oztürk S, Konuk O, Ilgit ET, Unal M, Erdem O. Outcome of patients with nasolacrimal polyurethane stent implantation: do they keep tearing? *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2004;20(2):130-135.
6. Lanciego C, Toledano N, De Miguel S, Perea M, Padilla M, Rodriguez-Merlo R, Dávila J, Ibarburen C, Cano C, García IR, García LG. Resolution of epiphora with nasolacrimal stents: results of long-term follow-up in a multicenter prospective study. *J Vasc Interv Radiol*. 2003;14(11):1417-1425.
7. Yazici Z, Yazici B, Parlak M, Tuncel E, Ertürk H. Treatment of nasolacrimal duct obstruction with polyurethane stent placement: long-term results. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;179(2):491-494.
8. Paúl L, Pinto I, Vicente JM, Armendariz A, Moreno G, Baraibar MC. Nasolacrimal stents in the treatment of epiphora: long-term results. *J Vasc Interv Radiol*. 2002;13(1):83-88.
9. Leong SC, Macewen CJ, White PS. A systematic review of outcomes after dacryocystorhinostomy in adults. *Am J Rhinol Allergy*. 2010;24(1):81-90.
10. Muscarello L, Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Cafiero G, Barbarisi A. A critical overview of ESEM applications in the biological field. *J Cell Physiol*. 2005;205(3):328-334.
11. Ramírez-Camacho R, González-Tallón AI, Gómez D, Trinidad A, Ibáñez A, García-Berrocal JR, Verdager JM, González-García JA, San Román J. Environmental scanning electron microscopy for biofilm detection in tonsils [in Spanish]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2008;59(1):16-20.
12. Eloy P, Martínez A, Leruth E, Levecq L, Bertrand B. Endonasal endoscopic dacryocystorhinostomy for a primary dacryocystocele in an adult. *B-ENT*. 2009;5(3):179-182.
13. Tsirbas A, Davis G, Wormald PJ. Revision dacryocystorhinostomy: a comparison of endoscopic and external techniques. *Am J Rhinol*. 2005;19(3):322-325.
14. Quickert MH, Dryden RM. Probes for intubation in lacrimal drainage. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1970;74(2):431-433.
15. Song HY, Jin YH, Kim JH, Sung KB, Han YM, Cho NC. Nasolacrimal duct obstruction treated nonsurgically with use of plastic stents. *Radiology*. 1994;190(2):535-539.
16. Song HY, Lee DH, Ahn H, Kim JH, Kang SG, Yoon HK, Sung KB. Lacrimal system obstruction treated with lacrimal polyurethane stents: outcome of removal of occluded stents. *Radiology*. 1998;208(3):689-694.
17. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-1322.
18. Barakate M, Beckenham E, Curotta J, da Cruz M. Bacterial biofilm adherence to middle-ear ventilation tubes: scanning electron micrograph images and literature review. *J Laryngol Otol*. 2007;121(10):993-997.
19. Backman S, Björling G, Johansson UB, Lysdahl M, Markström A, Schedin U, Aune RE, Frostell C, Karlsson S. Material wear of polymeric tracheostomy tubes: a six-month study. *Laryngoscope*. 2009;119(4):657-664.
20. Nazaret S, Assade F, Brothier E, Freydiere AM, Bellon G, Courmoyer B. RISA-HPLC analysis of lung bacterial colonizers of cystic fibrosis children. *J Microbiol Methods*. 2009;76(1):58-69.
21. Bin Abdulhak AA, Zimmerman V, Al Beirouti BT, Baddour LM, Tleyjeh IM. Stenotrophomonas maltophilia infections of intact skin: a systematic review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;63(3):330-333.

Almudena Trinidad
Department of Otorhinolaryngology
Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda,
Manuel de Falla 1
28222 Madrid, Spain
Tel.: 34 911916004
E-mail: atrinid@yahoo.es